

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1964 - n°

T H E S E

présentée à la

Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Paris

(Pharmacie)

par

Colette PIETTE

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DU GRANULOCYTE BASOPHILE

(Cytochimie - Méthodes de dénombrement -

Variations numériques expérimentales)

Soutenue le : 1963

Jury : MM. Y. RAOUL, Président

P. DELAVEAU, Professeur

J. BORY, Professeur

Année 1964 - n°

T H E S E

présentée à la

Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Paris

(Pharmacie)

par

Colette PIETTE

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DU GRANULOCYTE BASOPHILE

(Cytochimie - Méthodes de dénombrement -

Variations numériques expérimentales)

Soutenue le :

Jury : MM.Y. RAOUL, Président

P. DELAVEAU, Professeur

J. BORY, Professeur

Année 1964 - 65

THESE

présentée à la

Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE, (O. ✱, C. U)	<i>Doyen</i>
	M. M. JANOT, (O. ✱, C. U) ...	<i>Assesseur</i>
	P. MALANGEAU, O. U)	<i>Assesseur</i>
	L. RODINEAU, ✱, O. U)	<i>Secrétaire Général</i>
Mme	S. FERRARI, U)	<i>Attachée Principale</i>
MM.	L. JEANDEL, O. U)	<i>Attaché</i>
Mme	C. PEILLON,	<i>Attachée</i>
Mle	G. BIDEAU,	<i>Secrétaire</i>
Mme	S. CERTAIN, O. U)	<i>Secrétaire</i>
	M. COUSIN,	<i>Secrétaire</i>
MM	A. DROUILLY, O. U)	<i>Secrétaire</i>
Mme	M. L. ESPINASSE, O. U)	<i>Secrétaire</i>
Mle	A.M. FAVERJON,	<i>Secrétaire</i>
MM.	G. FROISSART, O. U)	<i>Secrétaire</i>
Mme	L. WARNESSON,	<i>Secrétaire</i>

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE, C. ✱, C. U)	<i>Membre de l'Institut</i>
----	----------------------------	-----------------------------

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE, C. ✱, C. U) ..	<i>Membre de l'Institut</i>
	L. LAUNOY, O. ✱, C. U) ..	
	P. FLEURY, O. ✱, O. U) ..	
	M. MASCRE, O. ✱, C. U) ..	
	M. PICON, O. ✱, O. U) ..	
	C. BEDEL, ✱, O. U) ..	
	R. FABRE, C. ✱, C. U)	<i>Membre de l'Institut</i>

PROFESSEURS

MM. M. M. JANOT, O. , C. 
G. VALETTE, O. , C. 
R. PARIS, , O. 

M. GUILLOT, , O. 

J.A. GAUTIER, O. , O. 

Mlle S. LAMBIN, , O. 

MM. Y. RAOUL, , O. 

J. COURTOIS, , O. 

L. DOMANGE, , O. 

P. CRETE, , O. 

R. TRUHAUT O. , O. 

A. MORETTE , O. 

R. CAVIER, O. 

A. QUEVAUVILLER, , O. 

R. MOREAU, , O. 

MM. J. GUY, O. 

A. GERMAN, O. 

M. PIETTE, , O. 

P. MALANGEAU, O. 

M. GIRARD, O. 

G. DILLEMANN,

G. DEYSSON, O. 

J. FLAHAUT, 

A. LE HIR,

J. RENAULT, 

C. BOUDENE,

P. LARUELLE,

P. ROSSIGNOL,

A. MANGEOT, O. 

P. DELAVEAU,

Pharmacie galénique T.

Pharmacodynamie T.

Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale T.

Physique T.

Chimie organique T.

Microbiologie T.

Physiologie T.

Chimie biologique T.

Chimie minérale T.

Botanique T.

Toxicologie et Hygiène industrielle T.

Hydrologie T.

Parasitologie T.

Hygiène et Education sanitaire T.

Pharmacie chimique T.

Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques T.

Virologie et Sérologie T.

Biologie sanguine T.

Chimie analytique T.

Chimie appliquée à l'expertise T.

Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie T.

Cytologie végétale T.

Minéralogie T.

Pharmacie Galénique

Chimie organique

Toxicologie et Hygiène industrielle

Physique

Pharmacodynamie

Pharmacie Galénique industrielle T.

Matière Médicale

MAITRES DE CONFERENCES

MM. R. BOURDON,

Chimie analytique

Mlle Y. COHEN,

Sciences naturelles

G. LE MOAN,

Sciences appliquées

H. RENAULT, O. 

Pharmacie chimique

C. PAOLETTI,

Sciences appliquées

P. REYNAUD,

Sciences physico-chimiques

J. POISSON,

Sciences naturelles

A. DESVIGNES, 

Cryptogamie et technique bactériologique

F. PERCHERON,

Sciences appliquées

J. SAVEL,

Biologie animale

J. BORY,

Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	P. BINET,.....	Parasitologie
	A. CARLIER (FF),.....	Pharmacie galénique industrielle
	A. CAVE,	Pharmacotechnie
	P. CORRIEZ, (O. U).....	Physique
	C. DREUX: (FF),.....	Electrochimie appliquée à l'analyse
	P. GESTEAU,*, O. U	Physique biologique
	J.C. GOUNELLE,	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Biologie)
	H. GUERIN,*, O. U	Micrographie (3e année), essais des drogues végétales
	J. HARISPE, O. U.....	Chimie générale et pharmaceutique
	J. HENRY,.....	Chimie (4e année)
Mme	J. HUBERT,.....	Microbiologie
Mlle	Y. JUND (FF),.....	Microbiologie
Mme	N. LEGER (FF),.....	Parasitologie
MM.	R. LELUC,.....	Microbiologie
	A. LEMONNIER,.....	Chimie analytique (2e et 3e années)
Mlle	M. LOISEAU (FF),.....	Chimie (4e année)
	S. LONGUEVALLE, ...	Service des examens de chimie
MM.	J. MANDEREAU (FF),.....	Pharmacotechnie
Mlle	H. MORIN, O. U.....	Pharmacodynamie
MM.	NGUYEN PHU LICH (FF),.....	Toxicologie
	F. PELLERIN,.....	Chimie analytique (2e & 3e année)
	R. PERLES,.....	Chimie biologique
	P. POUILLAIN,.....	Hématologie.
Mme	M. ROBERT,.....	Sérologie
Mlle	A. ROLLEN, *, O. U.....	Biologie végétale
Mme	N. SALES (FF),.....	Biologie animale
Mlle	L. SEGUIN (FF), O. U.	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section physico-chimie)
Mme	M. SEILLER (FF),.....	Pharmacie galénique industrielle
MM.	J. YONGER (FF),.....	Chimie analytique (1e année)

BIBLIOTHEQUE

Mlle	Y. RUYSSSEN, *, O. U	Conservateur, chargée de la Direction
Mlle	S. LAVAUD,*, O. U.....	Conservateur
Mme	G. KREHMER, (O. U).....	Conservateur
Mme	A. DESGRIPPES, (O. U).....	Bibliothécaire



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A la mémoire de ma mère,

A mon père,

A mon mari,

A mon fils,

A tous ceux qui me sont chers.

A Monsieur le Professeur Y. RAOUL

Chevalier de la Légion d'Honneur.

Hommage de respectueuse reconnaissance pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Professeur P. DELAVEAU

qui a si aimablement accepté d'examiner
notre travail.

En témoignage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. BORY

qui a bien voulu faire partie du Jury
de notre thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de notre
vive gratitude.

INTRODUCTION

GRANULOCYTES BASOPHILES, LABROCYTES ET AUTRES CELLULES A GRANULATIONS METACHROMATIQUES.

Le granulocyte basophile (ou polynucléaire basophile) du sang circulant, qui fait l'objet de ce travail, a été décrit pour la première fois en 1891 par EHRLICH, qui le nomma "Blut-mastzell" par analogie avec des cellules tissulaires qu'il avait observées en 1877 et auxquelles il avait donné le nom de "Mastzellen" (1).

Ces deux sortes de cellules ont pour caractère commun l'affinité métachromatique de leurs granulations cytoplasmiques, qui se colorent en violet-rouge par des colorants basiques comme le bleu de toluidine, les azurs de méthylène ou le bleu polychrome de UNNA.

Les "mastzellen" (ou mastocytes, ou labrocytes) apparaissent ovoïdes ou allongés, ou en forme d'étoile selon les déformations dues aux pressions des cellules voisines ; leur dimension maximale peut atteindre 30 microns. Le noyau arrondi ou ovalaire est toujours difficilement perçu, car masqué par les nombreuses granulations. Celles-ci, irrégulièrement réparties à l'intérieur de la cellule, sont sphériques ; volumineuses, elles atteignent couramment 0,5 micron de diamètre dans de nombreuses espèces animales et dépassent même parfois 1 et 2 microns chez le Cobaye (WINKVIST, 1963). Au microscope électronique, elles apparaissent formées de matériel filamenteux (ROGERS, 1956). Le cytoplasme est homogène tant à l'état frais qu'après fixation ; il se teinte en bleu pâle par le bleu de toluidine.

(1) De "Mast", qui signifie engrais : il considérerait en effet les granules comme des réserves de nourriture.

La distribution des labrocytes dans l'organisme est liée à celle du tissu conjonctif : ils prédominent dans les gaines des gros vaisseaux et les travées conjonctives périartériolaires.

ARVY et QUIVY (1956), étudiant la répartition de ces cellules chez le Chien, ont noté leur abondance dans les tissus qui sont le siège d'une grande activité : les vaisseaux sont alors engainés par un véritable "treillis" de labrocytes tandis que ces derniers sont rares ou même absents dans les tissus qui se trouvent relativement au repos.

Dans la série animale, ces cellules tissulaires passent dans la circulation sanguine, l'Homme, seul, faisant exception ; cependant, dans une hémato dermatose décrite par HISSARD et coll. (1951 b) - la mastocytose - ; elles ont été signalées dans le sang. On les trouve également dans la moëlle osseuse ; elles y sont rares à l'état normal mais leur nombre s'élève de façon notoire au cours des pancytopenies.

C'est MAXIMOW (1906) qui fit la première étude comparée des mastocytes chez quelques mammifères ; par ailleurs, HELLER avait déjà remarqué dès 1904 l'absence de parallélisme entre le nombre des labrocytes tissulaires et celui des granulocytes basophiles sanguins. En 1938, MICHELS notait que les animaux qui ont peu de mastocytes ont beaucoup de basophiles (Lapin) et inversement (Chat, Rat, Souris). Cette opposition s'observe parfois dans d'autres classes que celle des mammifères, chez le Cyprin ou la Salamandre géante par exemple ; mais il n'est pas rare de rencontrer chez le même animal à la fois de nombreux labrocytes et de nombreux basophiles sanguins : c'est le cas de certains insectes (*Gongylus*) et de certaines tortues (*Emys*).

D'autres cellules à granulations métachromatiques ont été observées par WEILL (1921) dans la muqueuse utérine ; leur étude a été reprise par ASPLUND et coll. (1947), MAC KAY (1950) et HELLWEG (1957). Nous pensons qu'elles sont à rapprocher des "ménocytes" découverts en 1956 par NETTER et coll. dans le sang cataménial.

On retrouve enfin parfois dans le gargoylisme ou maladie de HURLER-PFAUNDLER des cellules très voisines en ce qui concerne leurs réactions cytochimiques (ROYER, 1959).

Ce sont surtout les mastocytes qui ont suscité au cours de ces vingt dernières années de très nombreux travaux, tant en cytochimie qu'en physiologie et, si nous avons quelque peu insisté sur ces cellules, c'est que nous aurons souvent à comparer les résultats de nos recherches sur les granulocytes basophiles avec ceux qui ont été obtenus sur les labrocytes.

CHAPITRE I

CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE GRANULOCYTE BASOPHILE ET OBJET DU TRAVAIL

1 - ASPECTS CYTOLOGIQUES.

a - Coloration panoptique.

Le granulocyte basophile du sang humain se présente sur les frottis colorés par la méthode classique de MAY-GRUNWALD-GIEMSA comme une cellule de 12 à 15 microns de diamètre dont le noyau, souvent pycnotique, en forme de trèfle à trois ou quatre feuilles, est assez difficilement visible : il est en effet partiellement caché par des granulations bleu-noir ou violacées qui remplissent plus ou moins complètement la cellule.

Ces granulations, inégales de taille, semblent parfois incluses dans une vacuole achromique ou, à l'inverse, contenir une vacuole centrale ; ce phénomène est vraisemblablement lié à la solubilité des granulations dans les milieux utilisés (eau, alcool méthylique) au cours de cette coloration, méthode qui a été critiquée par UNDRITZ (1946) pour cette raison ; la solubilité dans l'eau des granulations croît d'ailleurs avec leur degré de maturation (MARINONE , 1947).

L'importance de la fixation sur la colorabilité des granules métachromatiques avait déjà été soulignée au cours de l'étude des labrocytes tissulaires par MAXIMOW (1906) et par REGAUD et LACASSAGNE (1922) ; elle fut reprise en 1958 par KELLY et BLOOM.

b - Examen au microscope électronique.

Sur le granulocyte basophile observé au microscope électronique, on remarque, outre le noyau polymorphe souvent en forme de trèfle, un cytoplasme abondant avec mitochondries et un réticulum endoplasmique très développé. Chez le Rat, POLICARD et coll. (1959) ont signalé que les granulations basophiles sont plus souvent ovales que sphériques ; elles mesurent de 0,2 à 0,7 micron et sont de deux types. Les plus nombreuses ont un contenu dense et homogène, les autres, entourées d'une membrane, semblent incluses dans une sorte de vacuole.

A sa périphérie, le granulocyte est limité par une membrane de type habituel, lisse et régulière en certains points, avec de courtes villosités et des pseudopodes épais et courts en d'autres points.

Observant des leucocytes basophiles ganglionnaires, POLICARD et coll. (1962) ont insisté sur les différents aspects des granulations, qui apparaissent soit striées longitudinalement par des lignes denses, soit finement granuleuses dans toute la surface de la coupe. Dans certaines apparaît une disposition périodique ordonnée sous la forme d'une très fine striation régulière, d'aspect pseudo-cristallin, oblique ou transversale par rapport au grand axe du grain.

L'existence de structures du même type avait d'ailleurs été signalée chez le Cobaye par PEARSE (1955) et par WINQVIST (1960).

c - Examen en contraste de phase.

ACKERMAN et BELLIOS (1955), examinant le granulocyte basophile en contraste de phase, observent une mobilité un peu spéciale, par déplacement du noyau au lieu d'émission de pseudopodes cytoplasmiques comme chez les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles.

En contraste de phase également, BESSIS et TABUIS (1955) ont remarqué dans le sang humain normal la formation d'un cristal fusiforme au sein de certains granules lorsque ces derniers sont en milieux aqueux ; ce cristal, insoluble dans l'eau et seul à subsister après la destruction de la cellule consécutive à l'hypotonie, montre au microscope électronique une striation très régulière perpendiculaire à son axe (BESSIS et BRETON-GORIUS, 1959). Ce phénomène, qui semble spécifique des granulations basophiles du sang humain

normal, n'a pas été retrouvé dans les cellules des leucoses myéloïdes chroniques ni dans le sang des animaux de laboratoire, pas plus que dans les mastocytes soumis à un traitement identique.

2 - PRINCIPAUX CONSTITUANTS CHIMIQUES PRESENTS DANS LES GRANULATIONS.

a - Héparine .

La cytologie des granulocytes basophiles est dominée par le problème de la nature chimique des substances présentes dans les granulations caractérisées par leur basophilie et leur métachromasie.

La basophilie indique l'existence de composés porteurs de groupements acides. Quant à la métachromasie, c'est, selon la définition d'EHRlich, le fait que "certaines substances colorent certains éléments histologiques avec une nuance différente de la solution colorante".

Parmi les composants cellulaires, ceux qui peuvent provoquer le "virage métachromatique" sont avant tout les polysaccharides macromoléculaires possédant une fonction acide, ainsi que leurs sels (LISON, 1960). Les plus actifs sont ceux qui contiennent un ou plusieurs radicaux ester sulfurique ($R-SO_3H$) : acide chondroïtine-sulfurique, acide mucoïtine-sulfurique, diverses géloses extraites d'algues, et l'héparine, qui est un polyester sulfurique d'un polysaccharide. Mais la métachromasie révèle aussi d'autres corps, en particulier l'acide hyaluronique, cependant l'intensité de la réaction est très réduite.

C'est en 1937 que JORPES, HOLMGREN et WILANDER apportèrent les premiers arguments en faveur de la présence d'héparine dans les mastocytes, les recherches ultérieures de JORPES (1946) lui permettant d'être beaucoup plus affirmatif. Malgré les observations contradictoires de MARX et coll. (1957), une preuve formelle fut apportée par MAGNUSSON et coll. (1955), puis par SCHILLER et DORFMAN (1959).

Les granulocytes basophiles du sang ont d'abord été étudiés sur des sujets leucémiques. TOTTERMAN (1948), explorant les leucoses aiguës avec importante basophilie, cherche à savoir si ces cellules sont des héparinocytes, mais il conclut que les examens cliniques ne peuvent pas fournir de réponse. Quelques années plus tard, MARTIN et ROKA (1953) isolent, à partir des leucocytes d'un malade atteint

d'une hémopathie semblable, une substance thermostable et acido-résistante possédant une action anticoagulante identique à celle de l'héparine. Il semble que ce soit la première fois qu'une expérience biologique rende vraisemblable la présence de ce composé dans les basophiles humains. Ces travaux ont été confirmés par ceux de AMANN et coll. (1961). Une preuve formelle ne pourrait être donnée que par la caractérisation de l'héparine, soit par réaction chimique appropriée, soit à l'aide d'une héparinase, à condition toutefois qu'elle provienne de la même espèce animale que les cellules à analyser ; en effet, BELL et JAKES (1956) ont montré que les héparines extraites de diverses espèces zoologiques n'étaient pas identiques.

Par ailleurs, un problème reste posé : l'héparine se trouve-t-elle réellement localisée dans les granules comme l'assurent de nombreux auteurs (JORGENSEN, 1946 ; OLIVER et coll., 1947 ; FRIBERG et coll., 1951 ; KOKSAL, 1953 ; HAGEN et coll., 1959), ou dans les microsomes des espaces intergranulaires (JULEN et coll., 1950 ; HEDBOM et SNELLMAN, 1955) ?

b - Histamine .

L'histamine est un autre composé dont la présence semble liée à celle des labrocytes et peut-être à celle des granulocytes basophiles.

En 1953, RILEY et WEST montrent une corrélation entre la teneur d'un tissu en histamine et le nombre de ses mastocytes. Ces travaux furent confirmés par ceux de CASS et coll. (1954), GRAHAM et coll. (1955 a), HEDBOM et SNELLMAN (1955), BENDITT et MITZIGA (1955 a), ARVY et QIVY (1955 b).

SCHAYER et coll. (1956) prouvent la formation d'histamine par les labrocytes en démontrant que les composants cellulaires du liquide péritonéal du Rat ont le pouvoir de décarboxyler la l. histidine radio-active et de lier l'histamine marquée à l'intérieur de la cellule où elle s'est formée.

La démonstration histochimique de la présence de ce composé dans les labrocytes a été avancée en 1959 par SCHAUER et WERLE, puis par LAGUNOFF et coll. en 1960, elle a néanmoins suscité quelques objections.

L'identification de ce métabolite dans les granulocytes basophiles a fait l'objet de nombreuses recherches.

Après avoir montré que chez divers mammifères 70 à 100% de l'histamine sanguine se trouvent dans les cellules autres que les érythrocytes, CODE (1937 a) précise ensuite que chez l'Homme et le Cheval elle est contenue dans les granulocytes (1937 b). Cependant il remarque chez le Lapin une certaine activité histaminique au niveau des plaquettes - retrouvée également par MINARD (1940) - mais il explique cette présence par le fait que les leucocytes, très fragiles dans cette espèce, libèrent facilement ce composé qui vient se fixer sur les thrombocytes.

La localisation de l'histamine au niveau des granulocytes basophiles humains est due aux travaux de GRAHAM et coll. (1952), confirmés par ceux de EHRICH (1953) et de VALENTINE et coll. (1955).

Alors que chez l'Homme normal la moitié de l'histamine sanguine se trouve dans les basophiles (GRAHAM et coll. , 1955 b), il n'en est pas de même pour toutes les espèces animales (CODE et MITCHELL, 1957) : chez le Chien la quasi totalité de l'histamine du sang est transportée par les éosinophiles et chez le Cobaye ces deux types de granulocytes ne semblent impliqués que d'une façon secondaire.

Par ailleurs, on peut se demander sous quelle forme se trouve l'histamine à l'intérieur des granulocytes basophiles : libre, liée à l'héparine, ou liée à des protéines ?

ROCHA e SILVA et coll. (1943), à partir de sang obtenu par ponction cardiaque chez le Lapin, démontrent que la papaine libère l'histamine des cellules dans le plasma. En outre, la captation de l'histamine par l'héparine est possible (PARROT et LABORDE, 1951 ; KOBAYASHI, 1962) et, d'après SANYAL et WEST (1956), ces deux substances forment un complexe dans les tissus. PARRATT et WEST (1957 a) affirment que dans les mastocytes du Hamster, contrairement à ceux du Rat, la majeure partie de l'histamine est liée à l'héparine ; cependant, ARCHER (1961), étudiant la libération d'héparine à partir des labrocytes du Rat, constate que l'activité antithrombique n'est libérée qu'à la condition que les granules eux-mêmes soient détruits, alors que l'histamine peut l'être même si ces granules restent intacts.

En fait, l'histamine cellulaire existerait sous deux formes (HALPERN et coll. , 1953) :

- combinée, libérable par destruction mécanique des cellules et non immédiatement active,

- labile, mise en liberté par processus biologique et pathologique et par administration de substances histaminolibératrices. Elle peut être transformée en forme "active" en quelques minutes.

La première de ces deux formes correspond peut-être à une liaison avec l'héparine, et il n'est pas impossible que cette combinaison varie avec les espèces animales ; aussi le doute subsiste-t-il au sujet des granulocytes, qui sont moins bien connus que les labrocytes ; à propos de ces derniers KELLER (1958) suggère une liaison avec la sérotonine.

c - Sérotonine :

En effet, de nombreux auteurs ont affirmé la présence de ce métabolite au sein des labrocytes du Rat, de la Souris (BENDITT et coll., 1955 b ; CASS et coll., 1958 ; PARRATT et WEST, 1957 b ; BARNETT et coll., 1958 ; HAGEN et coll., 1959) et du Chien (RICE et coll., 1961). Par ailleurs, il faut ajouter que SCHINDLER et coll. (1959) ont décrit la synthèse de 5-hydroxytryptamine dans les cultures de mastocytes néoplasiques, mais selon SJOERDSMA et coll. (1957) il n'en existe pas dans les labrocytes humains. Il ne semble pas non plus qu'on en ait trouvé dans les granulocytes basophiles du sang circulant (MITCHELL et CASS, 1959).

3 - PHYSIO-PATHOLOGIE.

a - Origine et nombre .

Le granulocyte basophile est, parmi les leucocytes humains circulants, celui dont la durée de vie est la plus longue : huit à douze jours (OSGOOD et coll. , 1954).

Son origine est l'objet de controverses. Selon UNDRITZ (1946), il existerait une cellule-mère spécifique : le basophioblaste ; pour d'autres (DANTCHEV, 1952), le myéloblaste est une cellule unique pour les trois lignées : neutrophile, basophile et éosinophile ; et, même au stade de promyélocyte, il n'est pas toujours aisé d'affirmer la différenciation ultérieure dans un sens ou dans l'autre. Cependant, certaines de ces cellules se distinguent parfois par l'apparition de granulations de taille inégale, de couleur bleue plus ou moins foncée, à côté d'autres granulations violacées ou roses ; à un stade de maturation plus avancé, elles ont tendance à augmenter en nombre et à accentuer leur teinte violette.

Les chiffres normaux de granulocytes basophiles dans le sang circulant varient d'une espèce animale à l'autre : peu abondants chez l'Homme adulte - 20 à 40 par mm³ -, ils le sont beaucoup plus chez le Lapin - 200 à 400 - ; c'est pourquoi nous avons choisi cet animal pour notre expérimentation in vivo.

b - Variations physiologiques et pathologiques.

L'âge intervient peu, sauf dans le début de la vie : le nombre des basophiles, déjà élevé chez le nouveau-né, augmente encore dans les vingt-quatre premières heures puis diminue jusqu'à un minimum situé vers le cinquième jour ; il s'accroît à nouveau puis s'abaisse progressivement à partir de la sixième semaine (MITCHELL, 1955).

Il existe des variations nyctémérales : augmentation l'après-midi, tant chez l'Homme (BOSEILA, 1959 a) que chez le Lapin (BOSEILA, 1959 b), et durant le sommeil (OSADA, 1956).

On n'enregistre pas de différences marquées suivant le sexe.

Le taux des basophiles, augmenté pendant la menstruation (THONNARD-NEUMANN, 1958), est diminué au moment de l'ovulation (ZACHARIAE et coll., 1958) et au cours de la grossesse (THONNARD-NEUMANN, 1961). Cette chute observée pendant la grossesse, déjà signalée chez la Lapine gestante (BOSEILA, 1959 b), a peut-être aussi une cause thyroïdienne. On sait en effet que l'iodémie protidique de la femme enceinte révèle un hyperfonctionnement de la glande thyroïde : or, les thyrotoxicoses s'accompagnent toujours d'une diminution du nombre des granulocytes basophiles, tandis qu'une augmentation est constatée chez les myxoédémateux (INAGAKI, 1957 ; BRAUNSTEINER et coll., 1958 ; CAVAZZUTI et coll., 1959). Pourtant, alors que CAMERADA et LEO (1955) observent chez l'Homme normal une chute importante du taux de ces cellules après injection de thyroxine, BOSEILA trouve des résultats opposés, aussi bien chez l'Homme (BOSEILA et coll., 1959) que chez le Lapin (BOSEILA et MOLTKE, 1958).

Les glandes surrénales interviennent également, la cortisone produisant une diminution du nombre des granulocytes basophiles, chez l'Homme (CODE et Coll., 1954) et chez le Lapin (BOSEILA, 1958 a). L'A.C.T.H. agit aussi dans ce sens (BOSEILA et UHRBRAND, 1958). Les minéralocorticoï-

des semblent avoir une action opposée si l'on s'en tient aux travaux de GIROD (1956), qui constate une élévation du nombre de ces cellules chez le Singe après administration de désoxycorticostérone.

En pathologie, les granulocytes basophiles ont surtout été étudiés dans leur relation avec les états allergiques, mais les résultats sont parfois contradictoires. Alors que la moyenne des chiffres enregistrés dans l'urticaire est sensiblement diminuée (RORSMAN, 1957), on peut trouver des valeurs individuelles normales ou même élevées (RORSMAN, 1958) ; par ailleurs, l'asthme n'entraîne aucune modification (RORSMAN, 1958). Ce problème est particulièrement étudié par SHELLEY et JUHLIN (1961), qui utilisent l'exploration quantitative et qualitative des basophiles comme examen de laboratoire dans la mise en évidence des allergies.

L'urticaire pigmentaire reste aussi le sujet de nombreuses recherches (ELLIS, 1949 ; MENECHINI et coll., 1961 ; RORSMAN, 1962).

D'autres modifications du taux des granulocytes basophiles ont été signalées : diminution dans l'anémie de BIERMER, la phase aiguë de la lymphogranulomatose, les périodes fébriles des maladies infectieuses aiguës et chroniques (LABENDZINSKI, 1956) , l'arthrite rhumatoïde grave de longue durée (BOSEILA et coll., 1961).

4 - OBJET DES RECHERCHES.

Nos recherches , commencées voici plusieurs années, se situent donc à une période où nos connaissances sur le granulocyte basophile étaient moins avancées qu'à l'heure présente.

Nous avons abordé divers problèmes :

- a - Cytochimie : étude sur les composés chimiques présents au niveau des granulations cytoplasmiques spécifiques : hétérogénéité de ces organites, mise en évidence du soufre des composés mucopolysaccharidiques et appréciation du degré d'estérification.
- b - Mise au point d'une technique de numération directe des granulocytes basophiles dans le sang du Lapin.
- c - Influence de l'administration chez cet animal de mucopolysaccharides supposés présents au niveau des granulations

cytoplasmiques : héparine, acide chondroïtine-sulfurique, acide hyaluronique.

- d - Recherches sur l'histamine au moyen d'un libérateur de ce métabolite.
- e - Etude de l'action d'un composé antagoniste de l'héparine : le sulfate de protamine.

Les travaux correspondant aux paragraphes c, d et e n'ont pas été limités aux granulocytes basophiles mais se sont étendus aux variations des leucocytes totaux, des granulocytes amphophiles (= pseudo-éosinophiles) et des lymphocytes, non étudiés à notre connaissance dans ces conditions. Il ne nous a pas été possible d'examiner les réactions des éosinophiles vrais du fait de l'absence d'une méthode spécifique de numération directe et de l'imprécision des dénombrements sur frottis.

- f - Mise au point d'une technique hématologique de numération directe, rapide et précise, des granulocytes basophiles dans le sang humain, utilisable pour les besoins courants de la pathologie, dans un but de diagnostic ou de pronostic qui se précise au fur et à mesure que progressent les recherches sur ces cellules.

CHAPITRE II

ETUDES CYTOCHIMIQUES

I - ESSAIS DE DISSOCIATION EN MILIEU AQUEUX.

Lorsqu'on examine les granulocytes basophiles d'un frottis de sang coloré par la méthode de MAY-GRUNWALD-GIEMSA, on constate d'une cellule à l'autre des différences portant sur le nombre des granulations métachromatiques et l'intensité de leur coloration. Cette diversité se retrouve également à l'intérieur d'une même cellule où l'on voit les granulations, de taille très inégale, présenter des nuances variables.

Les différences constatées dans l'intensité des teintes semblent dues au fait que certains composants présentent plus d'affinité que d'autres pour les colorants ; il n'est donc pas interdit de penser qu'à ces disparités peuvent correspondre des résistances variables à une dissociation du complexe colorant-substrat en milieu aqueux. C'est ce que nous nous proposons d'étudier.

a - Chez l'Homme.

Des frottis de sang provenant d'individus normaux sont colorés, immédiatement après séchage, pendant 5 minutes en milieu hydro-alcoolique à pH : 4 selon une technique préconisée par PIETTE (1955 a), mais en remplaçant l'azur II par l'azur I, exempt de bleu de méthylène (ce dernier composé améliore en effet les contrastes, mais introduit une variable supplémentaire). Après un lavage à l'eau de quelques secondes et un séchage très rapide, un granulocyte basophile est repéré par un examen à sec et entouré d'un trait de crayon gras. A un instant déterminé, une goutte d'eau distillée est déposée sur la surface ainsi délimitée et l'excès enlevé pour ne laisser subsister qu'un mince film de liquide permettant

l'observation de la cellule avec un fort objectif à sec ($\times 40$). Ce granulocyte est dessiné au cours de la première minute de l'examen, qui est poursuivi jusqu'à décoloration totale, en renouvelant l'eau afin d'éviter toute dessiccation .

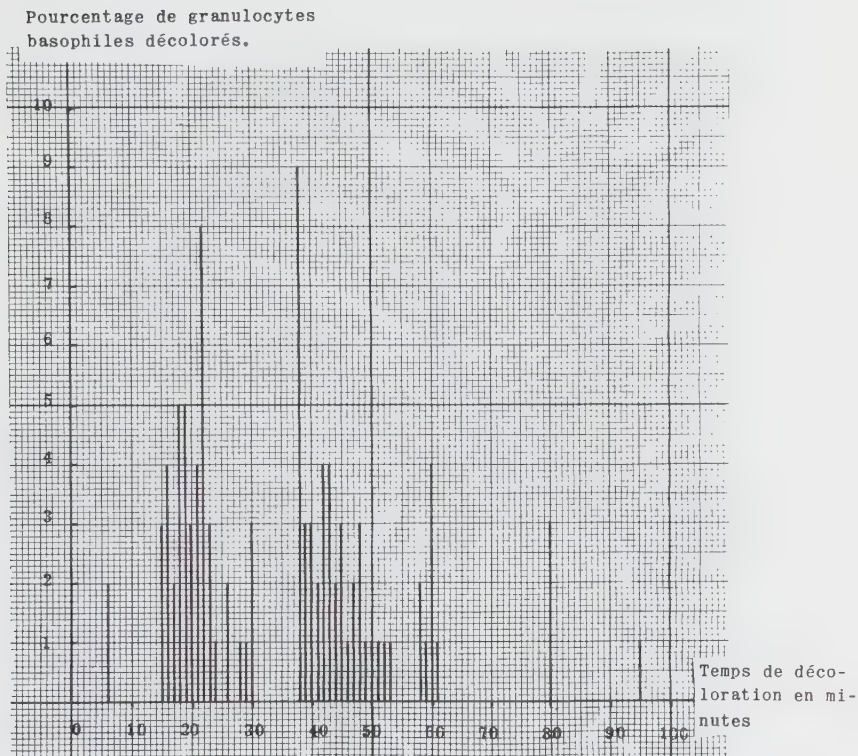
L'observation fait ressortir que si certaines granulations se décolorent complètement en quelques minutes, d'autres exigent 20, 30, 60, 90 minutes et même plus. Bien que les granulations intensément colorées au départ montrent le plus souvent une résistance particulière, de fréquentes exceptions existent. La vitesse de pénétration ne semble pas devoir être mise en cause : en effet, cette pénétration est extrêmement rapide dans un élément aplati par l'étalement et dont la taille est de l'ordre de 20 microns. D'ailleurs, les granulations périphériques sont parfois et aussi fréquemment que les autres les dernières à se décolorer. Celles qui offrent le plus de résistance laissent subsister après décoloration totale un stroma de teinte grisâtre.

L'étude du sang d'une dizaine d'individus normaux, portant sur de nombreux granulocytes basophiles choisis en des points divers des frottis, montre qu'il s'agit d'une propriété générale.

Les temps de décoloration complète étant extrêmement variables, nous avons étudié ensuite 100 granulocytes basophiles provenant d'un même individu. Ne sachant si le phénomène pouvait être influencé par le délai séparant la coloration de l'examen proprement dit, nous avons effectué un frottis nouveau pour chaque cellule étudiée. Les résultats sont consignés dans le graphique ci-dessous qui fait apparaître, outre les différences de comportement déjà signalées, l'existence de deux groupes plus importants que les autres.

GRAPHIQUE N° I

Temps de décoloration totale par l'eau de 100
granulocytes basophiles humains.



Ces résultats peuvent cependant être discutables du fait qu'il s'agit de 100 granulocytes pris au hasard, à des jours inévitablement différents. Aussi avons-nous, dans un deuxième temps, repris ces expériences sur un autre mode : plusieurs frottis du sang d'un même individu ont été colorés en même temps et soumis à une exploration systématique complète grâce à un diaphragme oculaire à évidemment carré. Chaque cellule est repérée par sa place (grâce à

l'échelle graduée du chariot de microscope) et sa structure (fixée par un dessin) : l'examen est pratiqué à l'immersion avec de l'huile de cèdre et celle-ci soigneusement éliminée par plusieurs lavages au toluène.

Tenant compte des données de la première expérience, nous avons ensuite plongé les lames dans des fioles de Borrel contenant de l'eau distillée, pendant des temps dépassant ceux qui correspondaient à divers groupes de décoloration, ceci dans le but de décolorer complètement un pourcentage donné de cellules. Nous avons ainsi réalisé quatre immersions successives de durée inégale : 10, 24, 36 et 30 minutes, correspondant à des temps de décoloration totaux de 10, 34 (10 + 24) , 70 (10 + 24 + 36) et 100 (10 + 24 + 36 + 30) minutes, et vérifié toutes les cellules après chaque immersion aqueuse.

Les résultats ont assez fidèlement corroboré ceux de la première expérience. En effet, les pourcentages des cellules décolorées en 10, 34, 70 et 100 minutes sont respectivement de 2, 47, 96 et 100 pour la première expérience et de 2, 48, 94 et 98 pour la seconde. Dans cette dernière, il subsistait après 100 minutes deux polynucléaires basophiles montrant encore quelques granulations colorées, qui disparaurent en 110 et 115 minutes.

Les 100 basophiles pris à des moments et sur des prélèvements différents constituaient donc une population hétérogène mais à peu près semblable à celle de tous les basophiles de plusieurs frottis effectués avec une même goutte de sang.

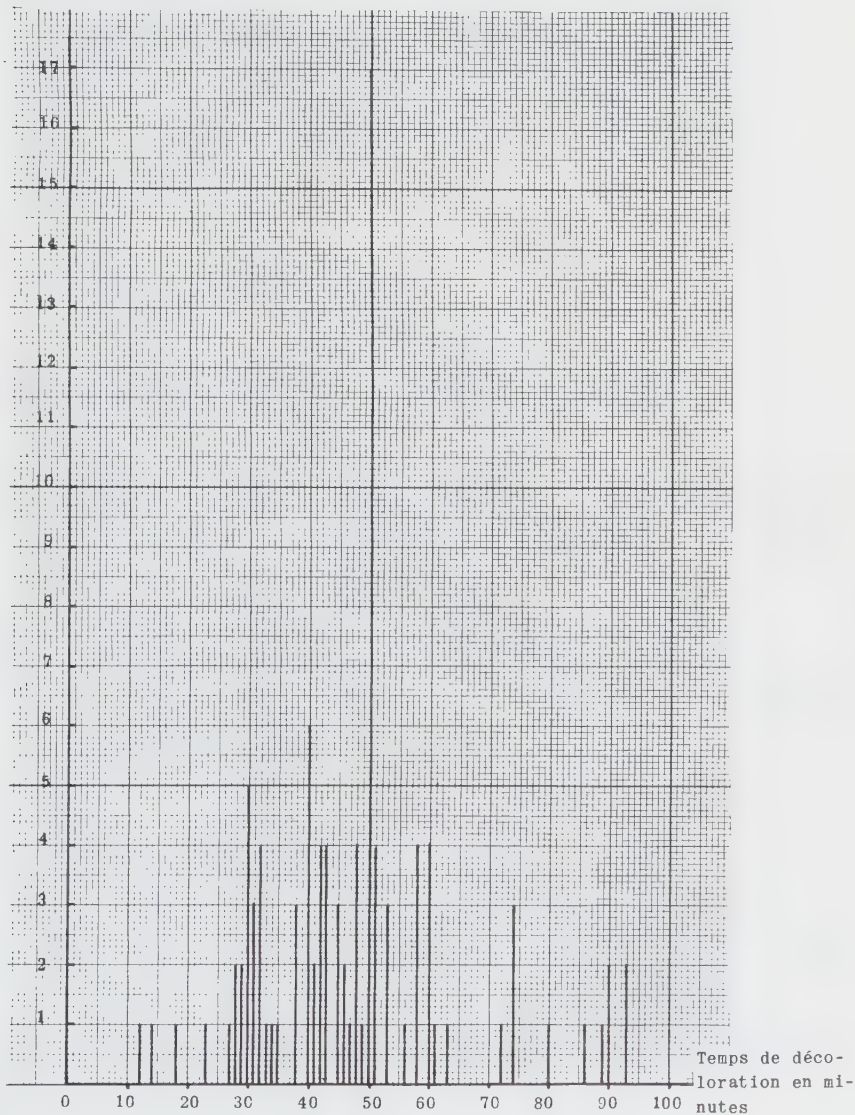
b - Chez le Lapin.

Tous ces examens ont été répétés sur sang de Lapin et nous avons constaté que les deux principaux groupes de décoloration observés sur sang humain se retrouvent chez l'animal, mais un peu décalés dans le sens d'une plus grande résistance (Graphique II).. Cette différence semble toutefois peu significative.

GRAPHIQUE N° II

Temps de décoloration totale par l'eau de 100
granulocytes basophiles de Lapin.

Pourcentage de granulocytes
basophiles décolorés.



Le nombre total de minutes nécessaires à la décoloration de 100 cellules fait apparaître une plus grande disparité:

- Homme : 3.526 minutes
- Lapin : 4.752 minutes.

Cette disparité se retrouve également par l'étude des résultats obtenus après 10 et 34 minutes d'immersion aqueuse, tant au cours de la première expérience (graphique) qui traite chaque cellule isolément, que de la seconde réalisée en fioles de Borrel. Ces observations sont consignées dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 1
Décoloration des granulocytes basophiles par
immersion dans l'eau distillée.

Matériel d'étude	Expériences	Pourcentage de granulocytes basophiles complètement décolorés pour un temps d'immersion aqueuse de :			
		10 min.	34 min.	70 min.	100 min.
Sang Humain	1ère Expér. (graphique)	2	47	96	100
	2ème Expér. (en fiole de Borrel)	2	48	94	98
Sang de Lapin	1ère Expér. (graphique)	0	23	89	100
	2ème Expér. (en fiole de Borrel)	0	32	92	100

Les différences de comportement observées au niveau des granulations s'expliquent par la plus ou moins grande solubilité du complexe colorant-substrat, qui conditionnerait d'ailleurs le pouvoir métachromatique (WALTON et RICKETTS, 1954). Notons cependant que le contact prolongé avec l'eau ne détruit pas totalement le substrat lui-même puisqu'il est possible de recolorer partiellement les granulations préalablement décolorées.

L'hétérogénéité constatée est due vraisemblablement à d'autres raisons que la différence de solubilité : concentration locale en substance chromotrope et nombre de groupements sulfuriques du mucopolysaccharide présent au niveau des granulations qui, selon de nombreux auteurs, serait de l'héparine (BEHRENS et TAUBERT, 1952 ; MARTIN et ROKA, 1953).

La caractérisation cytochimique de ce composé appelle à elle seule une mise au point.

2 - CARACTERISATION DU SOUFRE HEPARINIQUE.

a - Etude critique de la réaction.

TURCHINI et KHAU VAN KIEN (1954) ont essayé de préciser les divers stades de la synthèse héparinique : chez l'Homme normal, les étapes passeraient par l'acide hyaluronique, l'acide chondroïtine-sulfurique, pour arriver à l'héparine monosulfurique, puis trisulfurique. Dans les leucémies à basophiles, l'étude cytochimique montrerait l'existence exclusive d'acide hyaluronique (ASTALDI et coll. , 1953), du moins au stade myélocyte, car la maturation ultérieure conduirait à l'acide mucoïtine-sulfurique et à l'héparine monosulfurique (ASTALDI et coll. , 1955).

Ces composés sont tous des mucopolysaccharides acides formés par la condensation, à des degrés variables, d'unités constituées par l'acide glycuronique et une hexosamine ; Cette amine est la glucosamine, sauf pour l'acide chondroïtine-sulfurique où elle est remplacée par la galactosamine.

JORPES et GARDELL (1948) ont montré que l'héparine peut être théoriquement mono, bi, tri et tétrasulfurique. En outre, un reste sulfurique est lié à un groupement aminé sous la forme $-NH-SO_3H$ (JORPES et coll. , 1950).

Il nous a semblé intéressant d'étudier l'intensité des réactions cytochimiques de ce soufre héparinique qui existe donc sous deux formes :

- sulfamide des groupements aminés,
- ester sulfurique des groupes hydroxylés.

TURCHINI et KHAU VAN KIEN (1954) ont mis le soufre en évidence en utilisant la réaction au plombite de sodium (20 jours), ou à l'acétate basique de plomb (10 minutes), suivie d'un traitement par l'hydrogène sulfuré. Or, il nous a semblé qu'ainsi décrites ces réactions ne peuvent pas être assimilées à une caractérisation cytochimique du soufre héparinique. Il est plus probable qu'elles ne révèlent que l'existence de composés acides dont les sels de plomb sont insolubles.

L'application de ces réactions à des frottis sanguins pose comme premier problème celui de la fixation. Dès le début de notre travail, nous envisagions d'immerger les lames durant 3 semaines dans des solutions aqueuses à une température de 37° ; aussi, après de nombreux essais, avons-nous adopté une méthode peu courante en hématologie, la fixation par la chaleur. L'expérience prouve en effet qu'un séjour de 3 heures à l'étuve à une température de 110° conduit à une fixation solide qui n'altère pas les constituants cellulaires.

Les frottis ainsi fixés sont donc traités 10 minutes par l'acétate basique de plomb (extrait de Saturne du Codex français), lavés 1 à 2 minutes avec de l'eau distillée et séchés.

Après avoir déposé une lamelle sur la lame, on introduit par capillarité une goutte d'une solution aqueuse saturée de monosulfure de sodium 10 minutes avant l'examen microscopique, pratiqué avec un objectif à immersion, l'huile de cèdre étant déposée sur la lamelle.

On constate avant tout la présence d'un précipité noir et diffus de sulfure de plomb, ceci malgré le plus grand soin apporté au lavage qui suit l'utilisation de l'extrait de Saturne. On reconnaît cependant les hématies et les leucocytes, en particulier les granulocytes, dont les lobes nucléaires prennent une teinte bistre. Sur le sang humain, on finit par trouver de rares cellules bourrées de granulations noires de taille inégale et dont on aperçoit le noyau en forme de trèfle : ces deux caractères joints à leur rareté permettent de penser qu'il s'agit de polynucléaires basophiles.

Devant la mauvaise qualité de ces préparations, nous avons essayé de substituer, à l'acétate basique l'acétate neutre de plomb du Codex (en solution à 30%, poids/volume). Les frottis obtenus gagnent en propreté car ils ne sont plus troublés par des précipités. On retrouve les rares polynucléaires basophiles avec les granulations très nettement colorées en noir ; on observe également des cellules qui semblent pouvoir être assimilées aux éosinophiles par la forme de leurs lobes nucléaires et la taille des grosses granulations rondes et égales, faiblement colorées en bistre. Le protoplasme des autres granulocytes montre, en éclairage réduit, un aspect très légèrement chagriné.

Cette expérience, répétée sur du sang de Lapin, plus riche en basophiles, permet de trouver beaucoup plus de cellules positives.

En fait, il semble assez surprenant que les groupements sulfamidés et les esters sulfuriques de l'héparine puissent donner si facilement et si rapidement, en présence d'acétate de plomb, un précipité de sulfate de plomb transformable ultérieurement en sulfure de plomb. Or, la technique de MACALLUM, (1912) utilisée pour rechercher les sulfates libres dans les cellules, basée sur ce même principe, intercale entre le traitement plombique et la révélation au sulfure un lavage de 2 à 5 minutes par une solution décimale d'acide nitrique, dans lequel le sulfate de plomb est insoluble. Nous avons donc répété nos expériences en appliquant ce traitement nitrique : on constate alors que les recherches les plus minutieuses restent constamment négatives ; on ne retrouve aucun granulocyte présumé basophile et a fortiori aucun autre leucocyte. Ceux-ci ne sont pas pour autant disparus comme en témoigne un examen du frottis en lumière réduite.

Le premier protocole opératoire ne serait donc pas caractéristique du soufre héparinique bien que les cellules positives décelées au cours de ces recherches soient bien des granulocytes basophiles.

Pour le prouver, nous avons repéré des basophiles sur des frottis de sang de Lapin et de sang humain colorés par l'azur I de méthylène en milieu hydro-alcoolique à pH : 4. Les lames ont ensuite été immergées dans la solution d'acétate de plomb à 30 %, à une température de 37°, pendant 3 heures, temps nécessaire à l'obtention d'une décoloration complète. Après lavage et vérification de décoloration, nous les avons traitées par le sulfure de sodium et retrouvé très aisément toutes les cellules préalablement repérées et

dessinées : les granulations métachromatiques étaient exactement remplacées par des granulations noires, tant pour leur nombre, leur forme et leur répartition dans la cellule.

Par contre, cette expérience répétée en intercalant un traitement nitrique ne révélait aucune réaction positive dans les cellules repérées au préalable, cellules qu'on pouvait pourtant retrouver sur la lame, mais totalement dépourvues de granulations.

Nous avons repris les expériences en substituant l'acétate basique à l'acétate neutre de plomb : les résultats furent absolument identiques.

Nous en concluons donc que le traitement de frottis de sang par les sels de plomb en solution concentrée, puis par le sulfure de sodium, révèle de façon satisfaisante les granulations cytoplasmiques du polynucléaire basophile, mais cette réaction ne peut pas être considérée comme une caractérisation cytochimique du soufre héparinique.

Nous pensons que le plomb est simplement précipité par les protéines légèrement acides de certains leucocytes, ce qui explique que les noyaux présentent une teinte bistre (nucléoprotéines). Le sulfomucopolysaccharide des basophiles étant fortement acide retient énergiquement le métal lourd, ce qui se traduit par une intense coloration noire après action du sulfure de sodium. Ces combinaisons plombiques sont cependant dissociées par l'acide nitrique dilué et le plomb, libéré, est éliminé par lavage ultérieur, ce qui explique le résultat négatif.

En outre, dans certaines cellules sanguines existent d'autres substances qui seraient - a priori - susceptibles de donner une réaction positive au plomb, ce sont des protéines érythrocytaires de réaction faiblement acide : substance réticulo-filamenteuse des réticulocytes, granulations des hématies ponctuées et corpuscules de HEINZ.

C'est dans le but de vérifier cette hypothèse que nous avons entrepris l'étude de ces trois éléments particuliers.

1 - Substance réticulo-filamenteuse des réticulocytes.

Le réticulocyte est un érythroblaste jeune qui vient de perdre son noyau et dont le cytoplasme renferme une substance réticulo-filamenteuse de nature protéique, révélée par les colorants basiques en coloration vitale.

Il ne peut donc être question d'avoir recours à la fixation par la chaleur. Nous avons donc tenté de mettre le sang dès son issue des vaisseaux directement en contact sur lame avec la solution d'acétate neutre de plomb, puis d'opérer comme pour une coloration habituelle de réticulocytes, c'est-à-dire homogénéiser, recouvrir d'une lamelle qui déborde la lame et placer le tout dans une chambre humide en prenant soin de soulever la lamelle de temps en temps pour assurer le mélange. Après 10 minutes, on effectue un frottis. Si on traite directement ce frottis par le sulfure de sodium, il se forme de nombreuses précipitations qui rendent la lecture très difficile mais permettent néanmoins de déceler certaines hématies renfermant un précipité noir. Il est évident que ces constatations sont sans valeur. Il faut donc rechercher un autre procédé.

Les tentatives faites pour éliminer l'excès de plomb sur lame avant l'addition de sulfure étant restées vaines, nous avons essayé de faciliter le lavage en abandonnant la coloration sur lame au profit d'une coloration en milieu liquide, obtenue en faisant tomber le sang directement de la plaie cutanée dans un tube à hémolyse renfermant quelques millilitres de solution plombique. L'ensemble est homogénéisé par retournement et, à condition de laisser à température ordinaire pendant un temps n'excédant pas dix minutes, il ne se produit pas d'hémolyse. Après avoir centrifugé à grande vitesse, les cellules se trouvent rassemblées à la partie supérieure ; il suffit alors d'aspirer la solution plombique et de laver les hématies avec une solution isotonique de nitrate de potassium à 15,5 grammes par litre, le chlorure de sodium n'étant pas utilisable du fait de la formation de chlorure de plomb insoluble. La suspension homogénéisée est transvasée dans un tube propre et centrifugée à nouveau pour recueillir les hématies, cette fois-ci rassemblées au fond du tube. On procède encore à deux autres lavages en changeant de tube à chaque fois avant de prélever une partie du culot de centrifugation pour la confection d'un frottis qu'on sèche rapidement.

Il suffit de déposer sur l'étalement une goutte de solution saturée de sulfure de sodium et d'examiner à l'immersion après avoir recouvert d'une lamelle. Si la propreté de la préparation laisse encore à désirer, on répète le lavage du culot d'hématies avant d'effectuer un nouveau frottis que l'on obtient alors de qualité parfaite, ce qui permet d'observer les réticulocytes renfermant des granulations noires assez nombreuses. La substance basophile ainsi révélée n'existe pas sous forme granulaire dans les réticulocytes mais

à l'état diffus. Elle se sépare sous forme de vacuoles ou granulations sous l'influence de certains colorants comme le bleu de crésyle, ou par le plomb dans le cas présent.

La préparation permet aussi de noter une réaction légèrement positive dans les leucocytes : elle n'est pas limitée au noyau (désoxyribonucléoprotéides) mais se retrouve aussi dans le cytoplasme (ribonucléoprotéides). Les petits lymphocytes, d'une taille voisine de celle des réticulocytes, s'en distinguent par la présence de leur noyau, aisément identifiable.

2 - Granulations des hématies ponctuées.

Les granulations basophiles des hématies dites ponctuées rencontrées dans certains états anémiques, en particulier dans le saturnisme, et qui correspondent comme on le sait à un état immature de la cellule, sont dues à la condensation d'une protéine protoplasmique acide. Elles prennent aisément les colorants basiques et se teintent en bleu par la technique de MAY-GRUNWALD-GIEMSA effectuée avec une eau légèrement alcaline (pH : 7, 8). Bien qu'il ne soit pas nécessaire de colorer les frottis immédiatement, rappelons qu'elles disparaissent complètement par un séjour de 24 heures à une température comprise entre 30 et 35° (LAVERGNE et coll., 1953).

Nos expériences ont porté sur le sang d'un malade atteint de saturnisme qui présentait des hématies à granulations basophiles. Les frottis ont été traités selon la technique décrite ci-dessus à propos des réticulocytes. Nous avons obtenu un résultat positif mais il importait toutefois de s'assurer qu'il ne s'agissait pas d'hématies granulo-filamenteuses. Comme ces dernières disparaissent rapidement dans le sang extravasé, nous avons effectué un prélèvement sur héparine et nous l'avons laissé 3 heures à température ordinaire ; dans ces conditions, il ne subsiste pas de réticulocytes (comme en témoigne une coloration au bleu de crésyle) alors qu'il reste un pourcentage suffisant d'hématies ponctuées.

Des frottis sont alors effectués, les lames étant fixées à l'alcool absolu pendant 15 minutes, afin de préserver les érythrocytes à granulations basophiles.

Après traitement par le réactif plombique, on constate une disparition presque totale des cellules sanguines. Nous avons donc repris la fixation par la chaleur, mais de façon différente, par passage rapide des lames 3 à 4 fois dans la flamme d'un bec Bunsen.

Ce n'est qu'après un examen prolongé - nécessité par la perte considérable de cellules positives - que nous avons pu retrouver avec certitude quelques-unes des hématies à granulations basophiles.

Là encore, un traitement nitrique intercalaire conduit à des résultats négatifs.

3 - Corpuscules de HEINZ,

Restait encore à étudier le cas des hématies à corpuscules de HEINZ. Ces derniers sont de petites granulations arrondies, toujours peu nombreuses et visibles après coloration vitale (bleu de Nil et violet de méthyle) à l'intérieur de certains érythrocytes. On les rencontre dans les cas d'intoxications par les poisons méthémoglobinisants, au cours d'anémies hémolytiques cryptogénétiques et aussi chez les splénectomisés, mais il est possible d'en préparer in vitro par action de la phénylhydrazine (LAMBRECHTS et coll., 1946 ; NIZET, 1946 ; GAJDOS et coll., 1947). Nous avons utilisé ce réactif en présence d'un tampon alcalin et à une concentration relativement importante.

Le réactif final est obtenu par mélange de 2 solutions :

Solution A :

Phénylhydrazine	100 mg
Solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 g p.	
1.000, Q.S.P.....	50 ml

Solution B (tampon à pH = 9) :

HCl 0,1 N	6,4 ml
Solution aqueuse de véronal sodique 0,1 M	
(20,62 g p. 1.000).....	93,6 ml

Aussitôt après la piqûre, on introduit III à IV gouttes de sang dans un tube contenant :

Solution A : 4,9 ml

Solution B : 0,1 ml.

Après homogénéisation, le tube est porté à l'étuve à 37° où il séjournera deux heures, avant d'être centrifugé.

Il se forme à la partie supérieure un caillot fibrineux qu'on élimine ainsi que le liquide surnageant le culot. Une partie de ce culot, étalée sur lame et colorée par le violet de méthyle, montre que toutes les hématies renferment des corpuscules de HEINZ.

Cette vérification étant faite, le reste du culot est traité pendant 2 heures, à la température du laboratoire, par une solution à 30 pour 100 d'acétate neutre de plomb.

Il suffit alors de centrifuger, laver à plusieurs reprises par une solution isotonique de nitrate de potassium et révéler par le sulfure de sodium comme nous l'avons indiqué pour les réticulocytes.

L'examen microscopique montre que toutes les hématies donnent une réaction positive.

Conclusions :

Les réactions cytochimiques qui utilisent l'acétate de plomb, puis un sulfure alcalin sans intercaler de lavage à l'acide nitrique, révèlent donc l'existence de composés acides dont le sel de plomb est insoluble mais ne caractérisent en aucune façon le soufre héparinique.

b - Modalités techniques et essais d'interprétation.

Dans le but d'arriver à ce résultat, nous avons eu recours à l'ancienne technique de MACALLUM (1912), qui libère l'acide sulfurique par hydrolyse alcaline en présence de plomb pour former, in situ, un précipité de sulfate de plomb qu'un traitement ultérieur par l'acide nitrique permet de différencier des complexes plombiques de molécules de faible acidité. Le métal lourd est ensuite révélé par le sulfure de sodium.

= Fixation : séjour de 3 heures à l'étuve à 110°.

= Réactif : extrait de Saturne du Codex (acétate basique de plomb) additionné de 1/60 de son volume de lessive de soude (d. 1, 33). Ce mélange contient donc une petite quantité de plombite de sodium, mais il est moins alcalin que le réactif classique (DENIGES et coll., 1930) qui renferme 50 ml de lessive de soude pour 110 ml de réactif et s'avère inutilisable pour des cellules sanguines.

= Hydrolyse : nous opérons à 37° car une température inférieure nécessiterait une hydrolyse trop prolongée tandis

qu'une température supérieure risquerait d'altérer l'intégrité des frottis.

La durée du séjour à l'étuve pose certains problèmes car nous cherchons à hydrolyser deux fonctions différentes (ester et sulfamide) dont la réactivité n'est pas identique. Devant ces incertitudes, nous avons étudié dans un stade préliminaire l'influence du temps de contact sur un nombre important de granulocytes basophiles préalablement repérés par coloration métachromatique. Les durées de séjour ont varié de quelques heures à trois semaines. L'expérience a montré qu'une hydrolyse de 24 heures était suffisante.

= Traitement nitrique : la durée d'immersion des lames dans la solution décinormale d'acide nitrique, après traitement plombique, n'a pas soulevé de difficultés ; après avoir vérifié que les deux limites extrêmes proposées par MACAL-LUM - deux et cinq minutes - n'entraînaient aucune différence, nous avons fixé ce temps à deux minutes trente secondes.

= Révélation : la révélation par le sulfure de sodium nous a permis de préciser certains points de la technique.

Nous avons d'abord constaté que les préparations sont beaucoup plus facilement lisibles quand la solution de sulfure est déposée directement sur le frottis, l'interposition d'une lamelle très fine permettant l'utilisation d'objectifs à immersion de fort grossissement au cours de l'examen microscopique.

La durée d'action de cette solution a été fixée à 15 minutes afin d'obtenir une intensité maximale : en effet, les quantités de soufre héparinique, donc de plomb précipité à l'état de sulfate sont extrêmement faibles.

Le mode opératoire définitif est donc le suivant : les frottis fixés par la chaleur sont d'abord colorés par l'azur I selon la technique de PIETTE (1955 a) et on repère les granulocytes basophiles. Les préparations sont ensuite soigneusement rincées au toluène afin de ne laisser aucune trace d'huile de cèdre risquant de s'opposer à la pénétration du réactif plombique lors du séjour ultérieur de 24 heures à l'étuve à 37°. A la sortie de l'étuve, les lames sont lavées avec précaution à l'eau distillée et traitées par l'acide nitrique dilué pendant deux minutes trente. Les frottis sont ensuite recouverts par la solution de sulfure de sodium pendant 15 minutes et examinés à l'immersion après interposition d'une fine lamelle.

Dans ces conditions, les hématies et pratiquement tous les leucocytes - à l'exception des granulocytes basophiles dont nous reparlerons plus loin - donnent une réaction négative. Pourtant, quelques rares polynucléaires montrent une faible positivité : ce sont les éosinophiles, comme le prouve une coloration au MAY-GRUNWALD-GIEMSA effectuée en vue d'un repérage avant la mise en évidence par le plomb. Cette positivité des éosinophiles augmente d'ailleurs avec la durée d'hydrolyse ; mais après trois semaines de traitement plombique, les autres leucocytes donnent aussi une réaction positive.

On peut penser que le précipité constaté après trois semaines d'étuve est un phosphate de plomb provenant de l'hydrolyse des nucléoprotéides, en particulier des ribonucléoprotéides protoplasmiques (car la réaction est plus intense dans le cytoplasme que dans les noyaux). En effet, bien que le phosphate de plomb soit soluble en milieu nitrique assez concentré (2N), il peut très bien rester insoluble au cours du lavage rapide (2 minutes trente secondes) par l'acide en solution décinnormale. La démonstration en a été apportée par PIETTE en 1958.

En outre, il n'est pas impossible que la positivité des granulations éosinophiles soit expliquée par la présence de phospholipides, associés d'ailleurs à du phosphore organique lié, de nature indéterminée, mis en évidence par VERCAUTEREN (1953) sur des granulations isolées.

Il n'en reste pas moins vrai que dans les conditions où nous avons opéré (séjour de 24 heures à l'étuve à 37°), les autres leucocytes restant négatifs, nous croyons pouvoir conclure en la spécificité de la réaction pour le soufre.

Par ailleurs, ce soufre révélé pourrait être également celui des composés sulfhydrylés qui ont été signalés dans toutes les cellules sanguines, mais surtout dans les granulocytes éosinophiles et neutrophiles et dans la lignée rouge (BOIVIN et ROBINEAUX, 1955). Cependant, plusieurs faits vont à l'encontre de cette hypothèse :

= On voit mal comment, dans un milieu plombique alcalin et non oxydant, le groupement sulfhydrylé donnerait naissance à du sulfate de plomb.

= En supposant que les groupement sulfhydrylés aient pu se séparer de la molécule dont ils faisaient partie, il se serait formé un précipité de sulfure de plomb pendant le séjour à l'étuve. Or, l'examen microscopique des frottis

simplement lavés à l'eau distillée après leur sortie de l'étuve montre que la réaction est négative.

= Enfin, dans nos expériences, toutes les hématies ont toujours donné un résultat négatif, alors qu'elles renferment des groupements sulphydrilés.

Nous pensons donc que les réponses observées après 24 heures d'étuve correspondent bien au soufre mucopolysaccharidique car la réaction n'est positive que dans les seuls granulocytes basophiles. Cependant, elle varie dans d'assez larges proportions : dans certaines cellules on distingue à peine quelques granulations grisâtres (+) qui sont réellement à la limite de visibilité ; dans d'autres, la réaction est assez nettement positive, mais il faut reconnaître que, même dans les cas les plus favorables, les réactions sont toujours moins intenses que celles observées en l'absence de lavage nitrique.

Nous avons ainsi examiné 100 granulocytes basophiles de Lapin et autant de cellules humaines.

Si nous comparons les résultats enregistrés dans chacune des deux espèces nous remarquons une réaction moins intense chez l'Homme, comme le prouve l'examen du tableau suivant.

TABLEAU N° 2

Intensité de la réaction de caractérisation du soufre
héparinique

Intensité de la réaction obtenue avec les granulocytes basophiles	Proportion pour 100 granulocytes basophiles	
	Homme	Lapin
+	23	23
+	57	35
++	13	35
+++	7	7

En rapprochant ces résultats de ceux que nous avons relevés au cours de l'étude de décoloration par l'eau, on est conduit à penser qu'il existe chez le Lapin un composé de plus grande électronégativité que chez l'Homme. Cette différence est peut-être en rapport avec le degré d'estérification sulfurique du mucopolysaccharide. De nouvelles recherches cytochimiques ont donc été entreprises dans le but d'apporter quelques précisions dans ce domaine.

3 - APPRECIATION DU DEGRE D'ESTERIFICATION SULFURIQUE DE L'HEPARINE .

a - La réaction P. A. S.

Cette appréciation peut être abordée par la méthode dite " à l'acide périodique-réactif de SCHIFF", qui consiste à oxyder les polysaccharides par le premier réactif et à mettre en évidence par la fuschine bisulfitée les groupements aldéhydiques formés (réaction "Periodic Acid-SCHIFF" ou P. A. S. des Anglo-Saxons).

L'oxydation periodique brise aisément la liaison carbone-carbone lorsque deux atomes de carbone adjacents sont porteurs :

- l'un d'un groupe hydroxyle (-OH) ou carbonyle (=O),
- l'autre d'un groupe hydroxyle, carbonyle ou amine primaire ou secondaire (-NH₂ ou -NHR).

Si les groupes -OH ou -NH₂ ne sont pas attachés à des atomes de carbone contigus, ou si le groupe -OH est estérifié, l'oxydation n'a pas lieu.

La réaction P. A. S. appliquée aux sulfomucopolysaccharides permet d'intéressantes discriminations. L'héparine mono-sulfurique, possédant deux groupements -OH contigus disponibles, est P. A. S. positive (P. A. S. +) ; l'héparine trisulfurique, dont tous les radicaux -OH sont estérifiés, est P. A. S. négative (P. A. S. -). Quant à l'acide chondroïtine-sulfurique, dont la structure diffère de celle de l'héparine par remplacement de la glucosamine par la galactosamine, il est également P. A. S. négatif, la liaison osidique ne laissant pas subsister deux radicaux hydroxyles adjacents.

Si donc on compare, sur deux frottis effectués avec un sang identique, d'une part le pourcentage de cellules colorées

par réaction métachromatique et d'autre part celui des cellules P.A.S. positives, on pourra apprécier le degré d'estérification sulfurique des mucopolysaccharides présents au niveau des granulations cytoplasmiques des polynucléaires basophiles.

Il faut cependant noter que la réaction P.A.S. appliquée aux leucocytes sanguins met également en évidence le glycogène diffus dans le protoplasme des granulocytes neutrophiles ; elle se traduit par une teinte rose dans les monocytes et révèle également la présence dans certains lymphocytes de quelques granulations fortement positives dont la nature est inconnue. Autrement dit, l'examen comparatif des frottis colorés par les deux techniques citées ci-dessus ne doit comporter que l'appréciation cytologique des polynucléaires montrant des granulations cytoplasmiques.

L'expérimentation a été conduite sur des sangs humains et des sangs de Lapin.

- La coloration métachromatique est faite par l'azur II à pH 4 (PIETTE, 1955 a).

- La réaction P.A.S. est réalisée selon la technique de MAC MANUS (LISON, 1960), après fixation au liquide de CARNOY (15 minutes) qui conserve bien les granulations basophiles (TURCHINI et KHAU VAN KIEN, 1954). Afin de faciliter le repérage des leucocytes, les noyaux sont mis en évidence par le glychémalum .

Etant donné l'inégalité des répartition des granulocytes basophiles sur les frottis, ces derniers sont explorés systématiquement sur toute leur surface au moyen d'un diaphragme à évidement carré placé dans l'oculaire du microscope. Cet examen oblige à considérer un nombre important de leucocytes (plusieurs milliers) ; il s'avère extrêmement long car chaque cellule doit être observée avec soin.

Par ailleurs, il faut toujours recourir à des contrôles de coloration afin d'être sûr de l'authenticité des réactions de MAC MANUS négatives enregistrées. Chez l'Homme, cette vérification est aisément réalisable par l'examen des granulocytes riches en glycogène ; par contre, elle est assez délicate chez le Lapin car seulement 2 à 3 pour 100 des polynucléaires renferment ce composé (FLECK, 1956) ; en outre, alors que les lymphocytes humains montrent parfois des granulations positives, nous n'en avons jamais trouvé chez l'animal au cours de nos recherches portant sur plus de 10.000 leucocytes. Aussi, par mesure de précaution, avons-

nous toujours effectué des colorations parallèles de frottis sanguins et de cellules hépatiques qui - comme on le sait - sont très riches en glycogène ; ajoutons par ailleurs que pour un même réactif de SCHIFF, alors qu'une dizaine de minutes suffisent pour les frottis de foie, il est nécessaire de prolonger la coloration 1 heure 30 à 2 heures avec le sang.

b - Résultats enregistrés chez l'Homme .

Les examens ont porté sur le sang de 4 individus normaux ; ils ont fourni les résultats groupés dans le tableau n° 3.

TABLEAU N° 3

(voir page 33)

Il apparaît que les pourcentages de granulocytes basophiles révélés par coloration métachromatique sont toujours supérieurs à ceux des cellules donnant une réaction P. A. S. positive.

On peut donc en conclure qu'il existe dans les granulations des polynucléaires basophiles plusieurs sortes de mucopolysaccharides, les uns P. A. S. + , les autres P. A. S. - . La dernière colonne nous indique que 26,5 à 54 pour 100 des granulocytes basophiles renferment de l'héparine trisulfurique, ou éventuellement de l'acide chondroïtine-sulfurique, ou un mélange des deux substances. Bien que l'acide hyaluronique soit également P. A. S. - , nous n'envisageons pas sa présence car selon LISON (1960) il n'est pas décelable dans les préparations histochimiques par ses propriétés métachromatiques.

Par ailleurs, il est à remarquer que le taux des granulocytes basophiles donnant une réaction P. A. S. négative est d'autant plus important que le pourcentage des granulocytes basophiles totaux est plus élevé.

L'examen des granulocytes P. A. S. + permet de constater que ces cellules ne sont pas toutes identiques. Quand les granulations sont nombreuses ou volumineuses, le reste du protoplasme est incolore ; au contraire, quand elles sont rares ou fines, le cytoplasme est légèrement teinté, mais sans jamais atteindre l'intensité et l'homogénéité de celui des polynucléaires neutrophiles. Il n'est pas interdit de penser qu'il existe chez les basophiles une relation entre ces deux aspects cytologiques, l'un conditionnant l'autre.

TABLEAU N° 3

Coloration métachromatique et coloration de MAC MANUS appliquées aux leucocytes humains.

Sangs	Coloration métachromatique			Coloration de MAC MANUS				
	Leucocytes examinés	Granulocytes basophiles totaux	Granulocytes basophiles pour 100 leucocytes	Leucocytes examinés	Granulocytes basophiles (P.A.S.+to-taux)	Granulocytes basophiles P.A.S. + pour 100 leucocytes	Granulocytes basophiles P.A.S. - pour 100 leucocytes	Granulocytes basophiles P.A.S. - pour 100 granulocytes basophiles totaux (métachromatiques).
Ma...	5020	44	0,87	5220	24	0,46	0,41	47
Co...	6230	45	0,72	8240	41	0,50	0,22	30,5
Cl...	6680	76	1,13	7240	38	0,52	0,61	54
Bo...	6515	39	0,60	10200	45	0,44	0,16	26,5

Quant à la constitution même des granules, elle est certainement complexe. Le fait que le fixateur ne laisse pas diffuser l'héparine mais que l'amyrase salivaire négative la réaction P. A. S. des granulocytes basophiles (WISLOCKI et coll., 1949) conduit à penser qu'il existe au niveau de ces granulations du glycogène et de l'héparine faiblement liés, les molécules de substance métachromatique étant elles-mêmes unies lâchement à des protéines (KERBY, 1955).

c - Résultats enregistrés chez le Lapin.

Nous avons répété ces expériences sur des frottis de sang de Lapin dans le but de compléter notre étude comparative. Chez cet animal, la teinte observée au niveau des granulations positives est beaucoup moins intense que chez l'Homme ; ce fait est vraisemblablement en rapport avec la très faible concentration locale du composé chimique mis en évidence.

Les examens, qui ont porté sur 4 Lapins normaux , ont donné les résultats consignés dans le tableau n° 4.

TABLEAU N° 4

(voir page 35)

L'examen de ces chiffres permet de constater le très fort pourcentage de granulocytes basophiles donnant une réaction P. A. S. négative (87, 2 à 96, 6 pour 100).

On peut cependant différencier ces cellules sur les lames colorées par la réaction de MAC MANUS, grâce à d'autres caractères cytologiques, forme spéciale et structure chromatinienne du noyau ; nous avons d'ailleurs relevé pour chacune des lames colorées par cette technique les granulocytes reconnus comme P. A. S. - et P. A. S. + : les résultats obtenus sont groupés dans le tableau n° 5.

TABLEAU N° 5

(voir page 36)

TABLEAU N° 4

Coloration métachromatique et coloration de MAC MANUS appliquées aux leucocytes du sang de Lapin.

Sangs	Coloration métachromatique			Coloration de MAC MANUS				
	Leucocytes examinés	Granulocytes basophiles totaux	Granulocytes basophiles pour 100 leucocytes	Leucocytes examinés	Granulocytes basophiles P.A.S. + totaux	Granulocytes basophiles P.A.S. + pour 100 leucocytes	Granulocytes basophiles P.A.S. - pour 100 leucocytes	Granulocytes basophiles P.A.S. - pour 100 granulocytes basophiles totaux (métachromatiques)
1	2.504	47	1,88	2.508	6	0,24	1,64	87,2
2	6.025	159	2,65	3.223	3	0,09	2,56	96,6
3	2.710	53	1,96	3.022	5	0,16	1,80	91,8
4	3.371	85	2,52	3.344	7	0,21	2,31	91,6

TABLEAU N° 5

Granulocytes P.A.S. + et P.A.S. - comptés sur frottis de sang de Lapin colorés par réaction de MAC MANUS

Sangs	Leucocytes examinés	Granulocytes basophiles totaux	Granulocytes basophiles P.A.S. +		Granulocytes basophiles P.A.S. -	
			Totaux	Pour 100 granulocytes basophiles	Totaux	Pour 100 granulocytes basophiles
N° 1	2.508	45	6	13,3	39	86,7
N° 2	3.223	72	3	4,1	69	95,9
N° 3	3.022	62	5	8,0	57	92,0
N° 4	3.344	74	7	9,4	67	90,6

Si l'on compare les résultats de la dernière colonne du tableau n° 4 avec ceux du tableau n° 5, on trouve une concordance acceptable.

L'existence d'une réaction de MAC MANUS négative dans 90 % des granulocytes basophiles conduit à penser qu'il n'existe pas dans ces cellules d'héparine monosulfurique, mais de l'héparine comportant deux, trois ou peut-être quatre groupements sulfuriques par unité disaccharidique (JORPES et GARDELL, 1948). Il ne peut pas s'agir d'acide chondroïtine-sulfurique car ce composé est beaucoup moins chromotrope que l'héparine alors que les granulocytes basophiles du Lapin colorés par l'azur montrent toujours une teinte beaucoup plus accusée que celle qui est observée dans les cellules humaines.

Signalons par ailleurs qu'on retrouve chez le Lapin ce qu'on avait remarqué chez l'Homme : un parallélisme relatif entre le taux des granulocytes basophiles P.A.S. négatifs et celui des granulocytes basophiles totaux.

Conclusions

Notre étude relative aux mucopolysaccharides présents au niveau des granulations cytoplasmiques des polynucléaires basophiles de l'Homme et du Lapin permet d'avancer les conclusions suivantes :

- 1 - On peut mettre en évidence le soufre de façon certaine dans les deux espèces.
- 2 - La dissociation en milieux aqueux du complexe substance chromotrope-colorant métachromatique, sans permettre d'affirmation formelle, oriente vers l'hypothèse d'un degré d'estérification plus accentué chez le Lapin.
- 3 - L'utilisation de la réaction de MAC MANUS permet de confirmer cette hypothèse.

Ces différences sont probablement en relation avec l'existence dans la série animale d'héparines dissemblables par leur composition chimique et leur pouvoir anticoagulant, bien que leur activité métachromatique puisse être sensiblement identique (BELL et JAUQUES, 1956).

CHAPITRE III

METHODE DE NUMERATION DES GRANULOCYTES BASOPHILES DANS LE SANG CIRCULANT DU LAPIN

1 - REMARQUES SUR LA NUMERATION DIRECTE DES GRANU- LOCYTES BASOPHILES DU SANG.

a - Sa nécessité .

Un des buts de notre travail étant l'étude des variations du taux des granulocytes basophiles provoquées expérimentalement chez le Lapin sous l'influence de divers composants en relation avec leur physiologie, il s'avérait nécessaire de disposer d'une méthode satisfaisante de numération directe.

On peut certes étudier le taux de ces basophiles au moyen d'un dénombrement des leucocytes totaux d'une part et d'une formule leucocytaire d'autre part, mais ce procédé soulève plusieurs difficultés.

Il nécessite deux mesures, deux opérations grevées l'une et l'autre de causes d'erreurs qui peuvent s'annuler mais aussi s'additionner.

La numération de leucocytes, même effectuée sur un grand nombre de cellules (500) et avec un matériel irréprochable, laisse subsister une imprécision de l'ordre de 10 pour 100.

Quant à la formule leucocytaire, il est bien évident que sa précision est fonction non seulement de la quantité de leucocytes dénombrés, mais surtout du pourcentage de basophiles. Chez l'Homme, ce problème nous apparaît comme

pratiquement insoluble avec les moyens dont nous disposons actuellement. Pour un taux de 0,33 à 1 pour 100 des leucocytes, on arrive, en considérant un chiffre moyen de 6.000 leucocytes par millimètre cube, à un nombre de 20 à 60 basophiles par millimètre cube. Si on juge qu'il est nécessaire de compter une centaine de ces cellules, la formule leucocytaire devra porter sur 10.000 à 30.000 globules blancs. Encore faut-il ajouter que le chiffre obtenu n'aurait de valeur que si la répartition des éléments sur le frottis était homogène, ce qui n'est jamais le cas : les basophiles sont, pour des raisons mal connues, beaucoup plus fréquents sur les bords qu'au centre. Pour éviter cette cause d'erreur, il est nécessaire d'effectuer des frottis minces et de taille réduite dont on explorera systématiquement toute la surface en utilisant un oculaire de microscope muni d'un diaphragme portant un évidement carré ou rectangulaire, comme nous l'avons déjà dit plus haut. Nous avons eu recours à ce procédé chez l'Homme, mais il est extrêmement long, voire inutilisable pour un travail exigeant des numérations répétées.

La numération directe est certes beaucoup plus séduisante, mais elle n'est pas exempte de difficultés.

b - Ses difficultés :

Celles-ci sont de plusieurs ordres :

- 1 - Le faible nombre de granulocytes basophiles oblige à ne pas recourir à des dilutions sanguines supérieures à 1/10. Encore faut-il que le dénombrement soit effectué dans une cellule hématimétrique de grande profondeur (type cellule de NAGEOTTE), afin d'examiner un volume suffisant de sang ; mais la concentration en colorant du liquide de dilution doit mettre en évidence toutes les granulations basophiles sans cependant rendre invisible le quadrillage de l'hématimètre. En outre, certaines cellules n'ayant que peu de granulations ou des granulations faiblement métachromatiques, il est nécessaire de les examiner avec un objectif assez fort, ce qui rend impossible l'utilisation d'une chambre hématimétrique profonde.
- 2 - Les granulations basophiles étant hydrosolubles, on ne peut utiliser une simple solution aqueuse comme liquide de dilution.

- 3 - Ce liquide doit évidemment à la fois détruire les hématies, respecter les leucocytes, colorer électivement et sans diffusion les granulations des polynucléaires basophiles. Il s'agit là d'un problème auquel il nous semble présentement impossible d'apporter une solution absolument parfaite, en particulier pour la coloration élective. En effet, les seuls colorants à notre avis utilisables sont ceux qui donnent une réaction métachromatique importante. Or ce sont des colorants basiques qui teignent plus ou moins en bleu les noyaux et certains protoplasmes. Heureusement, l'intensité de la réaction métachromatique est considérablement plus grande que la réaction basophile observée et, dans l'immense majorité des cas, la discrimination des cellules ne pose pas de problème majeur.
- 4 - Le liquide de dilution se doit, de plus, de ne pas précipiter les protéines plasmatiques, en particulier l'hémoglobine libérée par hémolyse. Il s'agit là d'une difficulté majeure qui n'a pas été entièrement résolue par les techniques existant au moment où nous avons commencé notre travail et que nous allons maintenant envisager.

c - Etude critique des techniques existantes.

La première décrite est celle que MOORE et JAMES (1953) préconisent pour le sang humain. Ces auteurs diluent le sang au 1/10 avec une solution hydro-alcoolique de saponine et de bleu de toluidine et comptent les granulocytes dans 4 cellules de FUCHS-ROSENTHAL (profondeur : 0,2 mm).

Cette technique apparaît d'une mise en oeuvre assez difficile, l'exploration de 4 chambres hématimétriques étant une opération longue, de surcroît compliquée par l'apparition après 30 minutes d'un précipité autour des leucocytes, fait signalé d'ailleurs par les auteurs.

En outre, la dilution au 1/10 et le volume relativement restreint de l'hématimètre (3,2 mm³) ne permettent d'examiner qu'un nombre réduit de granulocytes basophiles.

ANGUIANO et coll. (1955) comptent dans une même cellule à la fois leucocytes et basophiles : le liquide de dilution est une solution hydro-alcoolique de colorants (GIEMSA, bleu de toluidine) tamponnée à pH 5,4-5,5.

LABENDZINSKI (1956) préconise des recherches quantitatives au moyen de gouttes épaisses : une goutte de sang est

étalée, séchée, puis colorée au GIEMSA ; on dénombre le pourcentage des granulocytes basophiles en fonction des leucocytes totaux. L'auteur reconnaît les basophiles au fait que "les granules se dissolvent pendant la numération, et abandonnent en partie la cellule pour pénétrer dans le plasma environnant, dont la fibrine prend une coloration métachromatique".

C'est en fait la technique de MOORE et JAMES qui reste depuis dix ans la plus employée, chaque utilisateur apportant d'ailleurs une modification quant au pH ou au mode d'addition de la saponine (OSADA, 1956 ; RORSMAN, 1957 ; BOSEILA, 1959 a). MITCHELL (1955), en étudiant le sang de nouveau-né, constate que l'hémolyse se fait mal et juge nécessaire de diminuer la teneur en alcool du liquide de dilution.

En 1957, INAGAKI préfère dissoudre le colorant dans une solution aqueuse d'acétate de plomb en milieu acétique.

2 - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE UTILISABLE CHEZ LE LAPIN.

a - Recherches .

Les études de PIETTE (1955 a) avaient montré la possibilité de colorer sur lame en milieu très acide les granulocytes basophiles du Lapin. Par ailleurs, nous savions qu'il était impossible d'éviter la lyse en milieu aqueux, soit par augmentation de la viscosité, soit par l'emploi de sulfate de protamine (PIETTE, 1955 b).

Nous avons donc cherché à utiliser un liquide de dilution non aqueux et au départ assez acide, mais l'expérimentation nous démontra bientôt que la coloration en milieu liquide était beaucoup plus délicate que sur lames : les concentrations en colorant, suffisantes dans ce dernier cas, ne mettent en évidence en milieu liquide que des granulations réfringentes ou à peine colorées. La reconnaissance des cellules basophiles exigeant trop d'attention pour servir à une numération directe, il nous fallait donc utiliser des solutions de colorant assez concentrées.

Par ailleurs, les liquides de dilution hydro-alcooliques firent rapidement la preuve qu'ils ne répondaient pas à des exigences en fait contradictoires : si le milieu était trop concentré en alcool les protéines précipitaient et s'il était trop dilué le contenu des granulations diffusait.

Par contre, les glycols, l'éthylène-glycol en particulier, apportèrent d'emblée des résultats encourageants.

L'hémolyse par des solutions de saponine s'avérant peu satisfaisante, notre attention se porta sur des acides minéraux et organiques. Beaucoup devaient conduire à des résultats décevants, sauf l'acide formique. Ce corps possède, en effet, un véritable pouvoir dissolvant sur les protéines. Pur, il détruit toutes les cellules, mais dilué dans de l'éthylène-glycol, il est doué d'un pouvoir hémolytique considérable, tout en conservant les leucocytes.

Deux des éléments du problème étant ainsi définis, nous avons adopté comme colorant l'azur II de méthylène. Quant à la question des proportions relatives de ces trois composés, elle devait être résolue par une série d'essais systématiques aboutissant à une solution capable d'hémolyser complètement un volume égal de sang (ce qui concentre les granulocytes basophiles cinq fois par rapport aux techniques antérieures utilisant une dilution au 1/10) en respectant les leucocytes et colorant les basophiles sans aucune diffusion. Le pH final du mélange sang-liquide de dilution est égal à 4, chiffre que nous nous étions assigné.

Cette dilution de sang au demi, assez inhabituelle, entraîne évidemment quelques contraintes qu'il nous faut maintenant souligner :

= Le mélange sang-liquide devient pâteux en une minute, ce qui oblige à remplir sans attendre les cellules cytométriques. Cet inconvénient devient un avantage en cas de plusieurs numérations à effectuer : si on dispose d'un nombre suffisant d'hématimètres, ceux-ci peuvent être placés pendant vingt-quatre heures dans une chambre humide sans qu'il y ait risque d'évaporation.

= En raison de l'intensité de la coloration du mélange, il est impossible d'apercevoir le quadrillage par transparence. On y remédie par l'emploi d'un diaphragme à évidement carré placé dans l'oculaire : on détermine une fois pour toutes la surface apparente de l'évidement.

= La sédimentation des leucocytes est nulle, ce qui conduit à employer des hématimètres de faible profondeur (0,1 mm). Cependant, les basophiles étant retrouvés facilement avec un grossissement assez faible (250), le jeu de la

vis micrométrique permet d'explorer en quelques secondes toute la profondeur de l'hématimètre pour chaque champ.

b - Technique adoptée.

1 - Matériel.

- α - Diaphragme oculaire portant en son centre un évidement carré d'environ 9 mm de côté.
- β - Micropipette à sang de 0,040 ml (type GOWERS, pour le dosage de l'hémoglobine, mais de volume double).
- γ - Hématimètre de 0,1 mm de profondeur avec plate-forme rectangulaire et supports plans latéraux pour la lamelle.

2 - Réactifs .

- α - Azur II (Geigy)..... 215 mg
Ethylène-glycol, Q.S.P. 100 ml
- β - Acide formique 5,3 ml
Eau distillée, Q.S.P. 100 ml

Mélanger au moment de l'emploi 0,7 ml de la première solution avec 0,3 ml de la seconde.

3 - Mode opératoire.

- α - Etalonnage du diaphragme (à effectuer une seule fois).

Au moyen d'un micromètre objectif, on détermine la taille apparente du côté du carré évidé du diaphragme pour un grossissement de l'ordre de 250 . Cette donnée, jointe à celle de la profondeur de la cellule, permet de connaître le volume de liquide correspondant à la surface évidée du diaphragme quand la cellule est remplie. On peut également, et sans avoir recours à un micromètre objectif, déterminer avec une bonne précision la surface de l'évidement au moyen de la partie quadrillée d'un hématimètre.

β - Dilution du sang et numération.

Dans un petit tube à hémolyse, on introduit 0,040 ml de liquide de dilution et une bille de verre de 2 à 3 mm de diamètre. Le sang à examiner est prélevé dès son émission avec la micropipette de 0,040 ml et rejeté dans le liquide de dilution du tube. Après avoir agité quelques secondes pour homogénéiser, une partie du mélange est aspirée et renvoyée trois ou quatre fois avec la micro-pipette à sang (rinçage). On agite de nouveau le tube une dizaine de secondes et on remplit, sans attendre, l'hématimètre (par capillarité, la lamelle étant au préalable posée).

Après des quelques minutes nécessaires à la coloration des granulations métachromatiques, la recherche des granulocytes basophiles est effectuée dans chaque champ en manoeuvrant la vis micrométrique pour explorer la profondeur de l'hématimètre. On peut ainsi explorer 300 à 400 champs en une heure. Il est d'ailleurs beaucoup plus aisé de déterminer une fois pour toutes le volume correspondant à une bande dont la largeur est celle de la plate-forme de l'hématimètre et la hauteur celle correspondant au côté de l'évidement carré du diaphragme. On explore ainsi un certain nombre de bandes à divers endroits de l'hématimètre.

Afin de fixer un ordre de grandeur, disons qu'avec le matériel que nous utilisons, 100 champs carrés correspondent à un volume de dilution sanguine de 0,70 mm³, donc à 0,35 mm³ de sang pur. Pour un Lapin ayant 300 granulocytes basophiles par millimètre cube de sang (valeur courante), cette méthode fait apparaître environ 1 granulocyte basophile par champ. On se trouve donc dans des conditions très acceptables pour une numération, en tout cas bien préférables à celles d'un décompte sur frottis.

Les granulocytes basophiles se distinguent très aisément des autres leucocytes et se détachent nettement sur le fond verdâtre de la préparation grâce à l'aspect rouge foncé de leurs granulations cytoplasmiques.

c - Résultats.

En l'absence de toute méthode de référence, nous avons dû nous résoudre à utiliser les décomptes sur frottis pour juger de la valeur des résultats obtenus par numération directe. C'est, comme nous l'avons dit, une méthode longue et fastidieuse, mais quand elle est exécutée patiemment sur des frottis de taille réduite, explorés systématiquement sur la totalité de leur surface, après coloration à pH 4 par l'azur II de méthylène, les granulocytes basophiles sont très facilement repérés grâce à leurs granulations rouge vif et distingués des autres leucocytes dont le noyau coloré en bleu permet l'établissement facile du pourcentage nécessaire au calcul de la valeur en nombre absolu.

Les résultats suivants sont ceux de trois animaux dont le sang était particulièrement riche en basophiles et pour lesquels il a été numéré sur frottis un total de plus de 35.000 leucocytes : nous avons en effet compté un nombre suffisant de cellules pour réduire les erreurs à leur minimum.

TABLEAU N° 6

(voir page 47)

L'erreur maximale est de 2,2 % ; les numérations de leucocytes dans un hématimètre, même si elles portent sur 600 à 900 cellules, ne conduisent jamais à une telle précision : il n'est pas impossible que nous nous soyons trouvée dans des circonstances favorables où les erreurs dues aux deux techniques s'annulaient.

Quoi qu'il en soit, nous pensons pouvoir avancer que la méthode préconisée est bien exacte.

Ceci étant, nous avons cherché à savoir quelle pourrait être la valeur des résultats, dans des conditions de travail courant, sur des Lapins dont le sang est moins riche en granulocytes basophiles et en réduisant le nombre de cellules comptées.

Il est évidemment nécessaire de numérer en chambre humide une quantité sensiblement identique de basophiles quelle que soit la teneur du sang en ces éléments. Cependant, ce ne sont pas toujours les sangs les plus riches qui peuvent donner a priori les résultats les plus exacts par rapport à la méthode de référence car, si l'hétérogénéité de réparti-

Comparaison des résultats de numérations de granulocytes basophiles (Méthodes directe et indirecte).

METHODE DIRECTE		METHODE INDIRECTE (DE REFERENCE)				
Numération des granulocytes basophiles dans un hématimètre		Numération des leucocytes totaux dans un hématimètre		Décompte des leucocytes sur frottis		
Cellules comptées	Nombre par mm3 de sang	Cellules comptées	Nombre par mm3 de sang	Leucocytes dénombrés	Granulocytes basophiles	
					Comptés	Nombre par mm3 de sang
339	966	770	7.700	9.349	1.200	988
267	760	890	8.900	12.530	1.080	767
239	397	630	6.300	15.270	970	400

tion (qui est une des causes d'erreur de n'importe quelle numération cellulaire) reste en principe identique, l'abondance des cellules ne favorise pas toujours l'exactitude d'un décompte : des erreurs d'inattention par défaut ou par excès sont toujours possibles, surtout quand le travail se prolonge, comme l'a montré BOCAGE (1943).

Des numérations ont été faites sur 80 à 100 basophiles par la méthode directe, les chiffres de référence sur frottis étant évidemment obtenus, comme précédemment, au moyen de décomptes portant sur environ 10.000 leucocytes.

TABLEAU N° 7

Comparaison des résultats de numérations de granulocytes basophiles par la méthode directe (décompte sur 80 à 100 éléments) et par la méthode indirecte de référence.

NOMBRE DE GRANULOCYTES BASOPHILES TROUVES (par mm ³)		POURCENTAGE D'ERREUR par rapport à la méthode de référence.
Méthode directe	Méthode de référence	
246	203	+ 22
98	96	+ 2
269	256	+ 5,1
437	502	- 13
180	212	- 15
397	434	- 8,5
349	326	+ 7
127	108	+ 17,5
413	396	+ 4,2

Il apparaît donc que dans les conditions d'un travail de routine normal, une erreur de l'ordre de 20 pour 100 reste possible. Ce chiffre peut sembler à première vue considérable : en fait, il surprend beaucoup moins lorsqu'on se rappelle que l'erreur faite sur une numération de leucocytes dans des conditions habituelles de travail est de l'ordre de 15 pour 100 (CARTWRIGHT, 1954).

Dans le domaine des granulocytes basophiles, cette approximation à 20 pour 100 près n'est pas d'une importance primordiale. Il convient en effet de ne pas oublier les variations considérables observées d'un animal à l'autre et, qui plus est, chez un même animal vivant dans des conditions normales.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce dernier point mais nous pouvons dès maintenant avancer qu'il convient de se montrer exigeant dans l'interprétation des résultats de numération et de ne parler de variations que lorsque celles-ci dépassent nettement celles qui peuvent être imputables aux erreurs possibles, à moins qu'elles ne se produisent toujours dans le même sens pour un stimulus déterminé.

CHAPITRE IV

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES ENREGISTREES CHEZ LE LAPIN APRES INJECTION D'UN SOLUTE ISOTONIQUE DE CHLORURE DE SODIUM

1 - PROTOCOLE OPERATOIRE GENERAL.

La technique de numération des granulocytes basophiles du Lapin, décrite dans le précédent chapitre, allait nous permettre d'étudier les variations quantitatives de ces cellules sous l'action de diverses substances supposées présentes au niveau de leurs granulations.

Cependant, il ne faut pas oublier que certains composés peuvent interférer sur la colorabilité des cellules circulantes ou de celles qui sont en formation dans la moelle osseuse au moment de l'injection.

Enfin les variations spontanées observées en expérimentation méritent d'être soulignées.

En effet, le taux des leucocytes et celui des polynucléaires basophiles diffèrent d'un animal à l'autre, mais aussi chez un même animal suivant l'âge, le sexe (BOSEILA, 1959 b), la nourriture et les saisons (PINNA PINTOR et GRASSINI, 1957) ; nous avons déjà signalé les variations nycthémérales (BOSEILA, 1959 a ; OSADA, 1956).

Par ailleurs, les diverses causes de frayeur provoquée par l'expérimentation (pesée de l'animal, introduction dans la boîte de contention, transport entre l'animalerie et le laboratoire, injection du produit étudié, prélèvements multiples) risquent d'entraîner des variations hématologiques.

Tous ces faits obligent à comparer les résultats expérimentaux obtenus avec ceux que l'on enregistre après injection de solution isotonique de chlorure de sodium chez des témoins convenablement choisis.

a - Choix des témoins .

Deux possibilités s'offrent à nous :

- Utiliser un seul lot d'animaux, chaque animal étant son propre témoin : il reçoit d'abord une injection de solution isotonique de chlorure de sodium, et huit jours après, dans des conditions identiques, le produit étudié.

- Utiliser deux lots séparés d'animaux provenant d'un même élevage : l'un servant de référence recevra la solution de chlorure de sodium à 9 pour 1.000, l'autre sera réservé à l'expérimentation. C'est cette dernière solution que nous avons adoptée.

En effet, GRAF et SWENSSON (1950) ont signalé des variations locales de la formule leucocytaire après détérioration des tissus et des vaisseaux sanguins par piqûre : on constate une augmentation des granulocytes basophiles, sensible trente minutes après et qui persiste vingt-quatre heures. Le nombre des prélèvements de sang à effectuer à l'oreille de chaque animal étant assez important, il devenait impossible, si l'on désirait pratiquer ceux-ci à distance les uns des autres, de prendre comme animaux d'expérience des témoins ayant subi une injection de solution isotonique de chlorure de sodium, suivie de nombreux prélèvements échelonnés sur plusieurs jours.

En outre, les hématomes, difficilement évitables au cours des perforations veineuses multiples, provoquent des perturbations hématologiques. Pour toutes ces raisons, nous avons adopté la comparaison avec des témoins représentés par des animaux neufs.

b - Age des animaux .

La nécessité de prises de sang répétées nous a fait choisir des animaux adultes ; en effet, chaque soustraction sanguine ayant pour corollaire une réaction compensatrice indésirable des organes hématopoïétiques, nous avons éliminé les jeunes dont le poids corporel et, partant, le volume sanguin, est plus réduit.

Par ailleurs, en raison de la faible solubilité de certains composés utilisés au cours de notre étude - en particulier l'acide hyaluronique -, nous avons dû injecter des volumes considérables de solutés (5 millilitres par kilogramme de poids corporel), ce qui entraîne une élévation importante de la masse sanguine. Il faut en effet considérer que, transposée chez l'homme de 70 kilogrammes, cette dose correspondrait à un volume de 350 ml et même 400 ml en tenant compte du rapport des volémies. Ceci constitue une raison supplémentaire pour utiliser des animaux adultes et implique la nécessité de pratiquer les injections très lentement afin de réduire à leur minimum les perturbations hémodynamiques.

c - Prélèvements de sang.

Afin d'étudier les réactions précoces et tardives, les prélèvements de sang sont effectués aux temps suivants : zéro, cinq, quinze, trente et quarante-cinq minutes, une, deux, quatre, huit et vingt-quatre heures, puis tous les jours du deuxième au neuvième jour, ce dernier temps étant choisi en fonction de la durée de vie moyenne des granulocytes basophiles.

Chacun de ces prélèvements, ainsi que celui qui précède l'injection, est effectué à l'aide d'un vaccinstyle sur une veine de l'oreille et sert aux déterminations suivantes :

- 1 - Une numération des polynucléaires basophiles, selon la technique décrite plus haut (Chapitre III) .
- 2 - Une numération de leucocytes sur une dilution de sang au 1/10e avec le liquide de HAYEM, le décompte étant effectué sur la totalité d'une cellule de MALASSEZ (1 mm³).
- 3 - Une formule leucocytaire après coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA, dans le but d'évaluer le taux des granulocytes amphophiles (pseudo-éosinophiles) et des lymphocytes.
- 4 - Un étalement mince et réduit coloré selon la technique de PIETTE (1955 a), destiné à l'examen qualitatif des granulocytes basophiles et éventuellement à l'évaluation du pourcentage de ces cellules au cas où le produit injecté produirait des modifications de colorabilité en milieu liquide. En outre, ces frottis servent de contrôle en cas de variations importantes du taux des basophiles.

d - Conduite générale de l'expérimentation.

Chaque Lapin, laissé à jeun depuis la veille à 17 heures, est pesé puis apporté au laboratoire le matin vers 7 heures dans une boîte de bois dont le couvercle à glissière dégage la tête et le cou de l'animal.

Il est laissé une demi-heure au repos avant de subir son premier prélèvement de sang (valeurs de base).

On injecte alors lentement dans une veine de l'oreille le soluté étudié (ici le soluté isotonique de chlorure de sodium) à raison de 5 millilitres par kilogramme de poids corporel.

Les prélèvements de sang ultérieurs sont effectués aux temps indiqués ci-dessus.

e - Expression des résultats.

Les sangs des divers Lapins, pris avant toute injection, ont des teneurs en éléments figurés très différentes d'un individu à l'autre, de ce fait, une variation égale en valeur absolue enregistrée chez deux animaux quelconques ne représente pas obligatoirement une réponse de même intensité : c'est ainsi par exemple que les nombres de granulocytes basophiles par millimètre cube sont respectivement de 102, 140, 230, 313, 173, 316, 590, 230, 259, 196 et 108. Pour une même élévation de 100 basophiles par millimètre cube, le premier Lapin aura doublé son chiffre de départ alors que le septième ne l'aura augmenté que de 17 % environ.

Aussi, pour apprécier les variations enregistrées au cours des multiples prélèvements avons nous choisi de comparer sous forme d'un rapport, les valeurs trouvées à un temps déterminé aux valeurs correspondantes relevées chez le même animal avant toute injection. Ceci nous permet de noter l'intensité et le sens de la réaction (rapport inférieur ou supérieur à l'unité).

Il ne peut être question de grouper la totalité des résultats individuels sous forme de tableaux ou même de courbes étant donné leur importance numérique. En effet, cette expérimentation - ainsi que celles qui suivront - porte sur une dizaine d'animaux, chacun d'eux étant soumis à 18 prélèvements servant à effectuer, comme nous l'avons dit plus haut, une numération de leucocytes totaux, une numération de granulocytes basophiles et une formule leucocytaire. Ils fournissent chacun un minimum de 7 résultats :

- nombre de leucocytes par millimètre cube,
- nombre de granulocytes amphophiles par millimètre cube,
- nombre de lymphocytes par millimètre cube,
- nombre de granulocytes basophiles par millimètre cube,
- nombre de granulocytes basophiles pour 100 leucocytes,
- nombre de granulocytes basophiles pour 100 granulocytes amphophiles,
- valeur du rapport $\frac{\text{granulocytes amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$.

Afin d'éviter de présenter une multitude de chiffres individuels tant dans ce chapitre que dans les suivants (plus d'un millier par expérience), nous ne retiendrons seulement que les variations à leur maximum d'amplitude et nous les grouperons par tableaux comportant :

- les variations extrêmes des rapports définis plus haut, enregistrées sur l'ensemble des animaux ;
- le moyen terme arithmétique des variations maximales relevées chez chacun des animaux ;
- la déviation standard du moyen terme ou erreur standard, qui permet de juger si les différences constatées sont ou ne sont pas significatives.

Au cours de la présente expérience, nous avons injecté du soluté isotonique de chlorure de sodium à 11 Lapins, dans les conditions précisées ci-dessus, afin d'étudier les réactions de ces animaux, qui constituent les témoins des expérimentations ultérieures.

- RESULTATS.

Nous étudierons successivement les résultats enregistrés dans les deux premières heures, puis ceux qui ont été observés entre 2 et 24 heures et finalement les réactions tardives.

a - Variations observées dans les deux premières heures.

TABLEAU N° 7

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm3	0,8 - 5,1	2,1	0,40
Granulocytes amphophiles par mm3	1,2 - 6,7	2,9	0,49
Lymphocytes par mm3	0,33 - 0,75	0,58	0,04
Rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$	2 - 5,8	3,8	0,44
Granulocytes basophiles/mm3	0,7 - 6,1	2,1	0,49
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,6 - 2,7	1,6	0,20
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,23 - 1,1	0,53	0,07

L'injection de soluté isotonique de chlorure de sodium entraîne une leucocytose : bien que dans les cinq premières minutes, on enregistre chez 4 Lapins une chute toujours brève et faible du taux des leucocytes totaux, on observe par la suite - en général entre la première et la seconde heure - une augmentation du nombre de ces cellules chez 10 des 11 animaux en expérience ; un seul conservera un chiffre plus bas que celui du départ (rapport : 0,8).

Cette leucocytose, d'importance variable porte surtout sur les granulocytes amphophiles, dont le nombre s'élève chez tous les animaux.

On note par ailleurs une baisse générale du chiffre absolu des lymphocytes, bien que chez 3 Lapins elle soit précédée par une élévation du nombre de ces cellules.

Il s'ensuit que le rapport :

$$\frac{\text{granulocytes amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$$

subit des augmentations importantes.

Les valeurs numériques des granulocytes basophiles s'élèvent dans 10 cas sur 11. Chez 7 animaux, cette élévation est d'une seule tenue, mais chez 3 autres elle est consécutive à une chute, immédiate ou retardée et d'importance variable (0,80 - 0,86 - 0,67). Le onzième animal (chez qui l'augmentation des basophiles ne se produira qu'après 48 heures) est le seul dont le rapport

$$\frac{\text{taux des granulocytes basophiles}}{\text{taux des leucocytes totaux}}$$

subira une baisse ; dans tous les autres cas, on note une augmentation.

Bien entendu, le pourcentage des basophiles par rapport aux amphophiles diminue de façon sensible.

b - Variations observées entre 2 et 24 heures.

TABLEAU N° 8

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm ³	1 - 3,4	1,8	0,23
Granulocytes amphophiles par mm ³	1,3 - 5,1	2,6	0,39
Lymphocytes par mm ³	0,2 - 1	0,7	0,07
Rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$	1,3 - 15,6	3,9	1,19
Granulocytes basophiles par mm ³	0,7 - 2,8	1,4	0,17
Granulocytes basophiles pour 100 leucocytes	0,3 - 2,7	0,9	0,22
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,2 - 1,2	0,51	0,10

Dans la majorité des cas on retrouve une leucocytose, due encore à une polynucléose, mais dont l'intensité légèrement réduite semble le prélude à un retour ultérieur vers la normale.

Le taux des lymphocytes reste presque toujours abaissé, tant en valeur absolue qu'en valeur relative.

Les variations simultanées, mais en général de sens contraire, des amphophiles et des lymphocytes sont telles que le rapport des chiffres indiquant le taux de ces deux catégories de leucocytes est toujours élevé, pouvant atteindre 15 fois sa valeur primitive.

Le nombre absolu des granulocytes basophiles est encore augmenté chez 7 animaux sur 11, mais une décroissance s'amorce chez certains ; l'un d'eux présente même une valeur inférieure à celle du départ.

Le pourcentage des basophiles dans la formule leucocytaire est abaissé de façon importante chez 8 animaux ; plus qu'à la diminution du taux des basophiles, ce phénomène est dû aux leucocytoses enregistrées.

Les variation du rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$ restent aux mêmes valeurs qu'au cours des deux premières heures.

c - Résultats tardifs .

L'examen des résultats correspondant aux prélèvements compris entre le second et le neuvième jour montre un retour aux valeurs de base, qui se situe souvent dans les 48 heures - les lymphocytes amorçant cependant parfois leur remontée dès la sixième ou la vingt-quatrième heure -, mais qui chez certains individus demande 3 à 4 jours.

Conclusions

Nous retiendrons de l'étude de ces animaux témoins l'importance des perturbations leucocytaires provoquées chez le Lapin par injection intraveineuse d'un soluté isotonique de chlorure de sodium suivie de prélèvements sanguins répétés. Ces perturbations résident principalement dans une augmentation du nombre des granulocytes amphophiles et basophiles, ces derniers dans

une proportion toutefois moins importante. On constate également une lymphopénie absolue.

La leucocytose, connue depuis longtemps (JOLLY, 1923), est rapportée aux efforts faits par l'animal qu'on immobilise, et à toutes les causes de frayeur ; or, nous avons réduit tout ce qui pouvait engendrer la peur, mais subsiste bien entendu l'injection intraveineuse et les prélèvements répétés. L'expérience montre qu'il est impossible d'éviter ce phénomène comparable à la réaction d'alarme avec participation de la cortico-surrénale.

Ces perturbations ne semblent pas être en relation avec un accroissement de l'activité de tous les centres hématopoïétiques car, si on peut penser que ces réactions sont le reflet d'une augmentation du nombre des mitoses, la diminution du chiffre des lymphocytes ne permet pas cette explication. Par ailleurs, l'existence de leucocytoses précoces, constatées parfois de façon très sensible au cours des cinq premières minutes, reste inexplicable par le simple jeu d'une multiplication cellulaire.

Il semble plus vraisemblable qu'interviennent des circuits sanguins en dérivation, susceptibles de modifier rapidement la composition du sang circulant après certaines sollicitations, comme le fait la circulation pulmonaire (BIERMAN et coll., 1951).

CHAPITRE V

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES APRES INJECTION D'HEPARINE

1 - RESULTATS EXPERIMENTAUX OBSERVES SUR LES LABRO- CYTES.

Nous savons maintenant que les granulocytes basophiles renferment de l'héparine, mais le rôle de ces cellules est-il d'élaborer, de mettre en réserve ou de transporter ce composé ? Nous avons cherché à savoir si l'introduction de ce métabolite dans le sang d'un animal entraînait une modification quantitative ou qualitative des cellules étudiées.

FONTAINE et ses collaborateurs (1953), étudiant le rythme d'élimination urinaire de l'héparine, constatent que 50 à 60 pour cent sont dégradés dans l'organisme, le reste s'éliminant par les urines. Quelle est la cause de cette dégradation ? Héparinase provenant du foie, dépolymérisation, ou fixation sur certaines protéines du plasma ? Les granulocytes basophiles interviennent-ils dans ce phénomène ?

De nombreux travaux étudient l'action de l'héparine sur les mastocytes tissulaires, mais les résultats sont souvent discordants.

BARBRY (1955) montre que chez la Souris blanche le nombre de ces cellules diminue sous l'influence de fortes doses d'héparine, ce qu'il interprète comme une preuve du rôle sécrétoire des labrocytes ; en 1960, HILL et PROPISIL retrouvent cette chute chez le Rat après injection de 2.500 unités d'héparine par voie sous-cutanée.

Cependant, de nombreux autres travaux plaident en faveur d'une mise en réserve de l'héparine dans les granulations de ces cellules. ASPLUND et coll. (1939), administrant ce produit par voie parentérale, constatent une augmentation du nombre et du volume de ces granulations ; ces résultats sont confirmés par les recherches de VON SCHURER (1946), FRICK (1950), KOKSAL (1953). DEGOS et COTTENOT (1953) plaident en faveur d'un stockage à commande surrénalienne.

HISSARD et ses collaborateurs (1951 a) montrent que l'injection intradermique d'héparine chez le Cobaye et chez des volontaires humains fait apparaître de petits nodules contenant de nombreux mastocytes formés aux dépens des fibroblastes.

VELICAN et VELICAN (1958) provoquent une mastocytose expérimentale chez le Cobaye par instillation intratrachéale d'héparine, ce composé pénétrant dans le cytoplasme des cellules du parenchyme respiratoire, puis dans le noyau ; dans une phase ultime apparaît une métachromasie diffuse après dissolution ultérieure des "bulles d'héparine". Ces auteurs notent également l'accumulation du produit instillé dans toutes les cellules réticulo-endothéliales, conjonctives ou sanguines intra-pulmonaires douées de pouvoir phagocytaire, même dans les polynucléaires neutrophiles, ces leucocytes présentant alors des aspects rappelant les granulocytes basophiles.

TURCHINI et KHAU VAN KIEN (1959) constatent également qu'en plus des labrocytes d'autres éléments tissulaires (histiocytes, macrophages, fibrocytes) peuvent capter ce produit. Les pseudo-mastocytes ainsi formés se distinguent des vrais par action de l'héparinase (ISIDOR, 1954).

2 - TRAVAUX PERSONNELS.

a - Protocole opératoire et posologie.

Désirant étudier in vivo l'action de l'héparine au niveau des leucocytes sanguins, nous avons utilisé l'administration du produit par voie intraveineuse, toute autre voie étant génératrice d'hématomes.

En thérapeutique humaine, la posologie quotidienne de l'héparine varie dans de larges proportions suivant le but recherché, mais elle dépasse rarement 500 milligrammes (c'est-à-dire 50.000 unités internationales). Le produit s'administre soit sous forme de perfusion, soit au moyen de trois injections intraveineuses par jour, chacune d'elles correspondant, pour un individu de 65 kilogrammes, à une dose voisine

de 2,5 milligrammes par kilogramme de poids corporel.

Des essais pratiqués sur des Lapins en vue d'orienter notre travail nous ont permis de constater l'absence de réactions hématologiques pour une semblable posologie, ce qui nous a conduit à augmenter progressivement les doses dans le but de réaliser une imprégnation importante. Nous avons fixé comme limite 25 milligrammes par kilogramme de poids corporel (soit comparativement dix fois la dose administrée chez l'Homme) pour l'expérimentation finale.

Le volume injecté a été déterminé, comme nous l'avons dit, en considérant la solubilité de l'acide hyaluronique et de l'acide chondroïtine-sulfurique, qui font l'objet d'expériences parallèles : rappelons qu'il est de 5 millilitres par kilogramme de poids corporel.

b - Résultats observés sur une série de 12 animaux (mode d'expression indiqué au chapitre IV).

1 - Variations enregistrées entre zéro et 2 heures.

TABLEAU N° 9

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm ³	1,3 - 2,7	1,85	0,16
Granulocytes amphophiles par mm ³	1,3 - 5,7	2,3	0,40
Lymphocytes par mm ³	1,1 - 4,3	2,0	0,31
Rapport <u>amphophiles</u> lymphocytes	0,6 - 4,3	1,8	0,30
Granulocytes basophiles par mm ³	0,4 - 1	0,75	0,10
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,3 - 0,8	0,50	0,05
Granulocytes basophiles p.100 granulocyte amphophiles	0,1 - 0,7	0,50	0,06

On note une leucocytose chez tous les animaux , mais un peu moins intense que celle produite par le soluté isotonique de chlorure de sodium. Elle est due encore aux granulocytes amphophiles, dont le nombre s'élève également dans tous les cas, mais aussi aux lymphocytes (le taux de ces cellules est double de celui du départ) ; cette lymphocytose est très hautement significative par rapport aux témoins alors que la leucocytose et la décharge amphophile ne le sont pas.

Le rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$ subit naturellement une variation moins grande que chez les témoins, ce phénomène étant également significatif.

La différence entre les deux réactions apparaît de façon encore plus certaine à l'examen des granulocytes basophiles. Certes, tous les animaux ne réagissent pas avec la même rapidité, mais dans tous les cas, sauf un (pas de variation appréciable), il se produit dans les deux heures une chute de leur nombre absolu , même au moment où la valeur des leucocytes totaux est supérieure à celle du temps zéro. On ne peut donc invoquer l'explication d'une réaction parallèle comme c'était le cas avec le soluté isotonique de chlorure de sodium, où nous trouvons deux valeurs identiques du moyen terme pour les leucocytes totaux et les basophiles. Avec l'héparine, la réaction basopénique est certes réduite, mais sa co-existence avec une leucocytose globale (1, 85) suffit pour faire penser qu'il s'agit bien d'un phénomène significatif. D'ailleurs , alors qu'après injection de soluté isotonique de chlorure de sodium le taux de granulocytes basophiles pour 100 leucocytes augmente en moyenne de 60 %, nous le voyons après injection d'héparine diminuer de 50 %.

2 - Variations enregistrées entre deux et vingt-quatre heures.

TABEAU N° 10

(voir page 63)

La leucocytose globale se maintient à une valeur assez élevée, dépassant même celle de la réaction précoce, contrairement à ce qui a été observé chez les témoins. La poussée amphophile s'accroît également, à l'exception de deux animaux qui ont pratiquement repris leurs valeurs de départ.

TABLEAU N° 10

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm3	1 - 3,1	2,0	0,02
Granulocytes amphophiles par mm3	1 - 7	2,8	0,57
Lymphocytes par mm3	0,4 - 2,5	1,3	0,21
Rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$	0,7 - 7,3	3,0	0,71
Granulocytes basophiles par mm3	0,3 - 1,3	0,8	0,09
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,2 - 1	0,5	0,07
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,1 - 0,7	0,4	0,05

Le taux des lymphocytes tend à redevenir normal, il est même chez deux Lapins légèrement inférieur à celui du temps zéro ; mais, chez les 8 autres, ce chiffre est encore sensiblement supérieur, présentant toutefois quelques oscillations.

Le rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$ reste souvent augmenté.

Le taux des granulocytes basophiles - qui reprend sa valeur initiale chez un animal - est encore diminué dans 8 cas, mais une remontée s'amorce chez 3 Lapins pour dépasser, chez l'un d'eux, le chiffre de départ (1,3).

Les pourcentages des basophiles par rapport aux leucocytes et aux polynucléaires amphophiles restent bas.

3 - Résultats enregistrés entre deux et neuf jours.

Le retour à la normale finit par se produire, mais plus lentement que chez les témoins. Cependant, tout rentre dans l'ordre en quatre à cinq jours.

Conclusions

La leucocytose amphophile observée chez le Lapin après injection intraveineuse d'héparine à la dose de 25 milligrammes par kilogramme de poids corporel est du même type que celle que produit un volume égal de soluté isotonique de chlorure de sodium.

Des différences statistiquement significatives apparaissent lorsqu'on compare dans les deux cas les chiffres de lymphocytes et ceux des granulocytes basophiles. Ces derniers faisant surtout l'objet de notre travail seront les seuls à être discutés.

On observe en effet une chute de leurs nombres absolu (25 %) et relatif (50 %), malgré la leucocytose, ce qui confère au phénomène un caractère particulier. Ces résultats ont d'ailleurs été retrouvés par BOSEILA (1959 c).

Il convient cependant d'aborder les explications possibles avec beaucoup de retenue. Quel que soit le mécanisme de réaction avancé à titre hypothétique, retrait des basophiles dans des circuits dérivés, leucolyse possible, a-t-on le droit de penser que l'héparinémie est la cause déterminante d'une basopénie qu'il serait évidemment tentant de qualifier de compensatrice ? Des études faites sur l'Homme, il ressort qu'il n'existe pas de rapport entre l'héparinémie physiologique et le taux des granulocytes basophiles (ANGELI et coll., 1955 a) mais les concentrations sanguines d'héparine à l'état normal sont incomparablement plus faibles que celles réalisées au cours de notre expérimentation.

Il est aussi nécessaire de souligner que le produit injecté au Lapin est une héparine commerciale retirée du poumon de Boeuf ; or, il n'existe pas une héparine mais plusieurs héparines différentes suivant les espèces animales (BELL et JAKES, 1956) et l'étude de l'éventuelle influence de cet anticoagulant physiologique sur le taux des granulocytes basophiles demanderait à être considérée en fonction de cette donnée. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que BOSEILA (1959 c) et nous-même constatons une chute des basophiles chez le Lapin alors que ANGELI et coll. (1955 b) et MAGNI et coll. (1956) observent chez l'Homme une augmentation du nombre de ces cellules, tandis que VON BRAUNSTEINER et THUMB (1958) ne relèvent pas de variation significative.

Par ailleurs, rien ne prouve que la présence d'un excès d'un métabolite doive à coup sûr retentir sur le nombre des cellules qui le contiennent à l'état normal. L'apport de substances intervenant dans la synthèse de ce composé étant peut-être susceptible d'interférer de façon plus sensible, nous avons poursuivi notre expérimentation dans ce sens.

oOo

CHAPITRE VI

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES

APRES INJECTION D'ACIDE CHONDROITINE-SULFURIQUE

1 - RAISONS DU CHOIX DE CE COMPOSE.

TURCHINI et KHAU VAN KIEN (1954), étudiant les polynucléaires basophiles du sang humain normal par voie cytochimique, ont mis en évidence différents composés : acide chondroïtine-sulfurique, acide hyaluronique, acide glycuronique et glucosamine. Ils en déduisent les divers stades de la synthèse de l'héparine, dont le précurseur immédiat serait l'acide chondroïtine-sulfurique, venant lui-même de l'acide hyaluronique qui ne comporte pas de groupement sulfurique.

Il est curieux de constater dans cette filiation le passage par une étape comportant une modification importante de la structure spatiale : la glucosamine des deux composés extrêmes est remplacée par la galactosamine au stade intermédiaire d'acide chondroïtine-sulfurique. Cette dernière hexosamine est également présente dans la β -héparine, découverte par MARBET et WINTERSTEIN (1951).

Quoi qu'il en soit, il nous a semblé intéressant d'examiner les éventuelles modifications apportées au taux des granulocytes basophiles circulants par injection de chacun des deux précurseurs.

2 - TRAVAUX PERSONNELS.

a - Protocole opératoire et posologie.

Nous avons procédé dans des conditions identiques à celles de l'expérimentation par l'héparine et avons injecté une

solution isotonique de chondroïtine-sulfate de sodium (1) à raison de 25 milligrammes de produit sous un volume de 5 millilitres par kilogramme de poids corporel.

b - Résultats observés sur 10 animaux (mode d'expression indiqué au chapitre IV).

α - Variations enregistrées dans les deux premières heures.

TABLEAU N° 11

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm3	0,55 - 1	0,84	0,05
Granulocytes amphophiles par mm3	1,5 - 4	2,4	0,28
Lymphocytes par mm3	0,27 - 1	0,68	0,08
Rapport amphophiles lymphocytes	1,8 - 6,2	3,2	0,42
Granulocytes basophiles par mm3	0,55 - 1	0,79	0,06
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,26 - 1	0,68	0,08
Granulocytes basophiles p.100 gra- nulocytes amphophiles	0,34 - 0,86	0,46	0,20

(1) Nutritional Biochemicals Corporation.

Alors que le taux des leucocytes totaux ne varie pas chez deux des dix animaux, on observe chez tous les autres une leucopénie franche, qui est due en fait à une lymphopénie car le nombre absolu des granulocytes amphophiles s'élève ; cette dernière augmentation est très importante vers la seconde heure et se traduit parfois à ce moment, malgré la chute des lymphocytes, par une légère leucocytose. Il s'ensuit que le rapport du nombre des granulocytes amphophiles à celui des lymphocytes s'accroît de façon notable.

Le taux des polynucléaires basophiles subit une diminution en valeur absolue et même en valeur relative, malgré une chute des leucocytes totaux ; elle paraît encore plus importante si on compare le nombre des basophiles à celui des amphophiles.

β - Variations enregistrées entre deux et vingt-quatre heures.

TABLEAU N° 12

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm ³	1,1 - 2,5	1,4	0,16
Granulocytes amphophiles par mm ³	1 - 3,7	2,1	0,29
Lymphocytes par mm ³	0,2 - 1,5	0,73	0,12
Rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$	1 - 18,2	4,2	1,6
Granulocytes basophiles par mm ³	0,43 - 1	0,8	0,06
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,22 - 1	0,7	0,07
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,19 - 0,86	0,5	0,07

La leucocytose réactionnelle, qui s'amorçait déjà au cours des deux premières heures chez certains Lapins, se généralise, mais parfois de façon assez discrète.

Cette leucocytose est du type amphophile car les taux de lymphocytes restent plus bas que ceux du départ chez 9 animaux sur 10.

L'élévation du rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$ s'accroît encore avec des disparités considérables d'un individu à l'autre puisque chez l'un d'eux ce rapport atteint 18 fois sa valeur de départ, ce qui explique l'importance de l'erreur standard.

La chute du taux des basophiles, tant absolue que relative, se maintient ; cependant, dans la moitié des cas environ, une discrète remontée semble s'amorcer.

γ- Résultats tardifs.

Ces perturbations s'effacent le plus souvent en trois à quatre jours, mais les granulocytes basophiles ne reprennent quelquefois leur taux initial qu'après 5, 7 et même 9 jours.

Conclusions

Comparativement aux résultats enregistrés chez les témoins, on remarque que le chondroïtine-sulfate de sodium produit :

- une leucopénie dans les deux premières heures,
- une chute prolongée du nombre des granulocytes basophiles.

On est frappé également par la baisse simultanée du taux de ces dernières cellules et de celui des lymphocytes, mais aucune relation entre ces phénomènes n'est vraisemblable, la lymphopénie s'observant déjà après injection de soluté isotonique de chlorure de sodium. En outre, le seul animal dont le nombre des lymphocytes s'est élevé sous l'action de l'acide chondroïtine-sulfurique est précisément celui chez qui on enregistre la plus importante chute du taux des granulocytes basophiles.

Quoi qu'il en soit, pour nous en tenir à ces dernières cellules, il faut constater que les diminutions observées sont toujours précoces, ce qui rend improbable une intervention de la moëlle, réduisant par exemple le nombre de ses mitoses, et plus vraisemblable le retrait du sang des cellules envisagées, retrait suivi ou non d'une leucolyse. Le prolongement dans le temps de la basopénie enregistrée est peut-être en rapport avec le haut poids moléculaire du produit injecté, conditionnant une élimination lente.

oOo

CHAPITRE VII

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES APRES INJECTION D'ACIDE HYALURONIQUE .

1 - RESULTATS EXPERIMENTAUX OBSERVES SUR LES LABRO- CYTES.

L'acide hyaluronique serait la matière première utilisée par les mastocytes (BURKL, 1952) et les granulocytes basophiles (TURCHINI et coll., 1954 ; RONDANELLI, 1956) pour la synthèse de l'héparine.

Sa présence dans les labrocytes, supposée par ASBOE-HANSEN (1950), est niée par SUNDBERG et coll. (1954) et ARVY (1955). Cependant VELICAN et VELICAN (1959) constatent que dans certains mastocytes la substance métachromatique est constituée exclusivement d'acide hyaluronique, alors que dans d'autres ce composé n'en représente qu'une partie.

Bien que TURCHINI et coll. (1954) soutiennent l'existence de ce mucopolysaccharide dans les granulocytes basophiles du sang normal, d'autres auteurs la nient (WISLOCKI et DEMPSEY, 1946 ; ASTALDI et coll., 1953). Pour ASTALDI et coll. (1953), on en trouverait seulement dans les cellules leucémiques.

Une étude de TURCHINI et coll. (1958) montre que l'injection d'acide hyaluronique chez le Rat produit une migration des mastocytes tissulaires vers les ganglions, où ils se groupent par cinq ou six et excrètent de nombreuses granulations.

A notre connaissance, aucun travail de ce genre n'a été entrepris sur les granulocytes basophiles.

2 - TRAVAUX PERSONNELS .

a - Protocole opératoire et posologie.

Poursuivant l'étude des éventuelles perturbations hémato-
logiques produites par les précurseurs de l'héparine, nous
avons administré à 10 Lapins des solutions d'hyaluronate de
sodium (1) correspondant à 5 pour 1000 en poids d'acide,
dans les conditions décrites à propos de l'acide chondroïtine-
sulfurique.

b - Résultats expérimentaux (mode d'expression indiqué au chapi- tre IV).

α - Variations enregistrées au cours des deux premières heures.

TABEAU N° 13

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm3	0,2 - 0,9	0,40	0,07
Granulocytes amphophiles par mm3	0,03 - 1	0,24	0,10
Lymphocytes par mm3	0,35 - 1	0,55	0,07
Rapport <u>amphophiles</u> lymphocytes	0,06 - 1,4	0,37	0,16
Granulocytes basophiles par mm3	0,04 - 0,8	0,22	0,07
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,15 - 0,7	0,37	0,05
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,9 - 11,8	5,7	1,21

(1) Nutritional Biochemicals Corporation.

Nous retrouvons la leucopénie observée avec le chondroïtine-sulfate de sodium : elle est ici constante, même encore plus sensible, et se manifeste souvent dès les cinq premières minutes. Elle affecte surtout les granulocytes amphophiles, dont la chute numérique est plus considérable et plus précoce que celle des lymphocytes. Le rapport amphophiles tombe environ au tiers de sa valeur primitive, lymphocytes

Le nombre absolu des granulocytes basophiles subit une diminution importante mais progressive et n'atteint sa valeur minimale qu'en deux heures. Cette lenteur enregistrée dans la réponse des basophiles, qui s'oppose à la précocité de la réaction des amphophiles, explique qu'on puisse constater au cours des soixante premières minutes une remontée importante du rapport basophiles ; amphophiles ; néanmoins, dans la seconde heure, ce rapport tend à reprendre lentement sa valeur de départ :

- Variations extrêmes : 0,16-3,10
- Moyen terme : 1,03
- Erreur standard : 0,08.

β - Variations enregistrées entre deux et vingt-quatre heures.

TABLEAU N° 14

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm3	0,7 - 9,7	2,9	0,81
Granulocytes amphophiles par mm3	0,7 - 13,5	4,7	1,15
Lymphocytes par mm3	0,22 - 2,2	0,7	0,19
Rapport <u>amphophiles</u> lymphocytes	1,2 - 20,4	6,6	1,8
Granulocytes basophiles par mm3	0,8 - 2,55	1,2	0,17
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,38 - 2,30	0,9	0,27
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,08 - 0,71	0,3	0,06

La leucopénie relevée au cours des deux premières heures est suivie d'une leucocytose qui atteint son maximum vers la quatrième ou la huitième heure ; seul un Lapin réagit de façon particulière, le taux de ses leucocytes restant toujours inférieur à sa valeur de base qui était d'ailleurs considérable (16.900 cellules par millimètre cube) ; on n'enregistre pas chez lui la forte poussée amphophile qui s'observe chez tous les autres animaux et qui est responsable de la leucocytose.

Les chiffres de lymphocytes restent abaissés - sauf chez l'animal qui a réagi paradoxalement - et le rapport amphophiles lymphocytes subit de ce fait des variations très importantes puisqu'il peut être multiplié par vingt comparativement aux valeurs du départ.

Le taux des granulocytes basophiles, fortement diminué au cours des deux premières heures, remonte lentement en présentant quelques oscillations, mais il ne dépasse que rarement les chiffres du temps zéro, ce qui explique la forte diminution du rapport basophiles amphophiles.

Y - Résultats tardifs .

Le retour à la normale demande plusieurs jours pour être complet.

Conclusions

Au cours de ces expériences, on est frappé par l'importance et la précocité de la leucopénie, qui porte surtout sur les amphophiles et qu'on peut assimiler à un véritable choc.

Le taux des granulocytes basophiles subit aussi une chute considérable mais toujours retardée par rapport à celle des amphophiles puisque, au cours des deux premières heures, le rapport basophiles amphophiles peut devenir 8, 9 et même 11 fois supérieur

à ce qu'il était au départ ; cependant, par la suite, l'augmentation du nombre des amphophiles fait tomber ce rapport au 1/5 ou même au 1/10 de sa valeur initiale.

Un phénomène du même genre avait déjà été signalé voici plus de trente ans par MORELLE (1931) qui, observant les leucocytes basophiles chez sept Lapins au cours de certains chocs expérimentaux consécutifs à l'injection intra-veineuse de sulfures colloïdaux, constate une forte leucopénie suivie de leucocytose ; cinq fois, le pourcentage des basophiles diminue, une fois il reste stationnaire et deux fois il subit une importante élévation. Cet auteur souligne que le taux des granulocytes basophiles décroît quand la leucopénie est inférieure à 2.000, mais qu'il s'élève lorsque la leucopénie reste modérée. Ces remarques, basées sur des résultats obtenus par l'étude de frottis, sont donc confirmées par des numérations directes.

oOo

CHAPITRE VIII

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES

APRES INJECTION D'UN COMPOSE LIBERATEUR D'HISTAMINE

1 - RESULTATS EXPERIMENTAUX ENREGISTRES SUR LES LABROCYTES.

Nous avons déjà examiné dans le chapitre premier la répartition de l'histamine dans les leucocytes et les plaquettes et nous savons, en outre, que les mastocytes sont très riches en cette substance. Il n'est donc pas étonnant que de nombreux auteurs aient expérimenté l'influence de libérateurs d'histamine sur ces cellules.

Presque tous observent, in vivo et in vitro, un éclatement ou une dégranulation des mastocytes chez le Rat (RILEY, 1953 ; RILEY et WEST, 1955 ; MOTA et coll., 1953 ; FAWCETT, 1954 ; NORTON, 1954) et chez le Chien (ARVY et QUIVY, 1955 a).

Sur la langue de Rana, ARVY (1955) constate une disparition des granules avec libération d'une substance métachromatique dans le tissu environnant.

Les résultats obtenus chez le Hamster (poche juguale) sont moins concordants : FEINBERG et coll. (1955) n'observent pas d'éclatement des cellules, alors qu'ASBOE-HANSEN et WEGELIUS (1956) enregistrent une dégranulation. Ces faits sont peut-être interprétables à la lueur des constatations d'ARVY sur le Rat (1956), selon lesquelles certains territoires sont entièrement dépeuplés de labrocytes alors que d'autres sont apparemment normaux.

Les corrélations probables entre les mastocytes et les granulocytes basophiles du sang circulant nous ont incitée à rechercher l'éventuelle influence des substances libératrices d'histamine sur les leucocytes du Lapin, suivant le protocole expérimental habituel, en opérant sur dix animaux.

2 - TRAVAUX PERSONNELS.

a - Choix du produit utilisé.

Le libérateur d'histamine le plus souvent employé est le composé dénommé 48/80, obtenu par condensation de β -méthoxy-phényléthylméthylamine et de formaldéhyde. Il est constitué probablement par un mélange du di, du tri et du tétramère (PATON, 1951).

L'étude pharmacologique de ce produit a été entreprise par PATON et SCHACHTER (1951). Quant à son mode d'action, il est encore imparfaitement connu et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches (HOGBERG et UVNAS, 1957, 1958 ; UVNAS, 1961 ; VAN ARSDEL et BRAY, 1961).

b - Posologie .

Après avoir constaté qu'une dose de 5 milligrammes par kilogramme de poids corporel entraînait toujours rapidement la mort de l'animal, et que 3 mg produisaient souvent un résultat identique, nous avons abaissé la posologie à 2 mg/kg, l'injection intraveineuse étant réalisée très lentement.

Les réactions extérieures observées varient beaucoup d'un individu à l'autre : nulles dans certains cas, elles peuvent être légères ou même très sensibles, se traduisant alors par une brève période d'agitation, suivie d'une chute de la tête sur le côté, et d'une gêne respiratoire. On note également une vaso-dilatation importante au niveau des oreilles, qui donnent issue, après piqure, à un sang noirâtre. L'animal redevient apparemment normal au cours de la seconde demi-heure.

ce qu'il était au temps zéro.

- chez les autres, l'action du composé 48/80 se traduit rapidement (5 à 15 minutes) par une chute très importante du nombre des basophiles : on peut voir ainsi leur valeur absolue passer de 354 à 5 par mm³, soit une disparition de plus de 98 pour cent des cellules.

Bien entendu, les rapports $\frac{\text{basophiles}}{\text{leucocytes totaux}}$ et $\frac{\text{basophiles}}{\text{amphophiles}}$ sont aussi très diminués, surtout dans les quarante premières minutes.

Cependant, au cours de la seconde heure, on constate souvent une ascension du taux des granulocytes basophiles, qui dépasse même celui du départ :

- variations extrêmes : 0,70-2,94
- moyen terme : 1,57
- erreur standard : 0,29

Cette augmentation est-elle une réaction secondaire compensatrice ou bien la chute constatée dans les vingt premières minutes est-elle le seul phénomène caractéristique, mais si fugace qu'on se trouverait ensuite en présence d'une poussée basophile analogue à celle que l'on observe chez les témoins environ au même moment ?

Il convient de noter toutefois qu'on n'enregistre pas cette augmentation secondaire chez les deux animaux dont les chiffres de basophiles n'avaient pas subi de diminution ; par conséquent, on peut penser que lorsqu'elle se produit, elle est bien le témoignage d'une poussée réactionnelle compensatrice.

Il n'en est pas moins vrai que la chute initiale reste le phénomène le plus sensible.

β - Variations enregistrées entre deux et vingt-quatre heures

TABEAU N° 16

(voir page 83)

TABLEAU N° 16

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm ³	0,90 - 2,70	1,5	0,22
Granulocytes amphophiles par mm ³	0,50 - 4,06	1,9	0,17
Lymphocytes par mm ³	0,63 - 1,85	1,2	0,12
Rapport <u>amphophiles</u> lymphocytes	1,5 - 16,3	5,3	1,9
Granulocytes basophiles par mm ³	1 - 2,28	1,7	0,61
Granulocytes basophiles pour 100 leucocytes	0,57 - 1,6	1	0,13
Granulocytes basophiles pour 100 granulocytes amphophiles	0,38 - 1,27	0,9	0,14

La leucocytose observée dans les deux premières heures a tendance à diminuer lentement, sur tout en ce qui concerne les granulocytes amphophiles. Le taux des lymphocytes redevient également normal mais en présentant toutefois quelques oscillations et avec un certain décalage dans le temps, comparativement aux amphophiles, ce qui se traduit par une persistance de l'augmentation du rapport amphophiles
lymphocytes

La valeur absolue du nombre des polynucléaires basophiles se maintient légèrement plus élevée que ce qu'elle était au départ, mais le rapport basophiles
leucocytes totaux dépasse rarement les valeurs enregistrées au temps zéro par suite du maintien d'une leucocytose modérée.

Y - Résultats tardifs.

Le retour à la normale se fait en quelques jours.

Conclusions

Des effets de l'injection du composé 48/80, nous retiendrons :

- a - La résistance totale de certains individus malgré l'importance des doses administrées ; elle a été retrouvée par HUNT et coll. (1961) chez 25 pour 100 des Lapins étudiés.
- b - L'absence de leucopénie, même en cas de choc.
- c - La chute considérable mais brève du taux des granulocytes basophiles du sang, qui paraît superposable à celle qui est observée sur les leucocytes tissulaires du Rat après action de ce même composé.

Nous avons donc examiné avec soin les leucocytes sur les frottis de sang colorés selon la technique de MAY-GRUNWALD-GIEMSA et au bleu de toluidine pour confirmer la raréfaction des granulocytes basophiles ; on note la fréquence accrue d'ombres de GUMPRECHT qui ne se retrouvent plus sur les étalements sanguins effectués au moment de la remontée du chiffre des basophiles, c'est-à-dire environ une heure après l'injection du produit.

BOSEILA (1958 c), utilisant ce même libérateur d'histamine à dose moitié moindre chez le Lapin, constate également une chute du taux des granulocytes basophiles, mais six heures après l'injection. Les discordances entre ses observations et les nôtres peuvent être dues à deux causes :

- Les temps de prélèvements de BOSEILA (2, 4, 6 et 24 h) : une réaction précoce passe inaperçue.
- La différence de dose : la rapidité de la réponse étant peut-être fonction de la quantité administrée.

Cependant HUNT et coll. utilisent également un milligramme par kilogramme et constatent une chute au cours de la première heure, tant chez le Lapin (1961) que chez le Poulet (1959).

On peut être tenté de rapprocher les résultats des expériences ci-dessus de ce qu'on observe au cours du choc anaphylactique chez divers animaux, car SHELLEY et coll. (1961) pensent qu'au cours de ce choc les basophiles libèrent leur charge d'histamine, comme le font les labrocytes (RILEY et WEST, 1953 ; MOTA, 1957 ; KELLER, 1958 ; BOREUS, 1960).

Cependant, il faut se souvenir que chez le Lapin le choc anaphylactique s'accompagne d'une diminution de l'histamine contenue dans le sang total (SCHACHTER, 1953). La complexité de cette question appelle d'autres recherches.

oOo

CHAPITRE IX

VARIATIONS HEMATOLOGIQUES APRES INJECTION DE SULFATE DE PROTAMINE

Après avoir observé les perturbations hématologiques provoquées par un libérateur d'histamine et certains composés existant au niveau des granulations du polynucléaire basophile, nous avons jugé intéressant d'étudier les effets de l'injection d'une substance connue pour son activité anti-héparinique : la protamine. Non seulement ses propriétés s'exercent in vivo en cas de surdosage par l'héparine, mais on les observe également in vitro : ce produit, peut, par un véritable déplacement, faire virer au bleu la teinte obtenue par un mélange de solutions diluées d'un colorant métachromatique et d'héparine, et précipiter ce dernier composé de ses solutions aqueuses.

1 - RESULTATS EXPERIMENTAUX ENREGISTRES SUR LES LABRO-CYTES.

BLOOM et coll. (1957), CASELLI (1957) et SMITH (1958), étudiant l'action du sulfate de protamine sur les mastocytes tissulaires, mettent en évidence une libération d'histamine, sans altération cellulaire. Cependant, PAFF et coll. (1955) avaient signalé l'apparition de vacuoles dans les cellules.

Il nous a donc semblé intéressant d'examiner l'action de cette substance sur les basophiles sanguins.

2 - TRAVAUX PERSONNELS.

a - Protocole opératoire et posologie.

Nous avons utilisé un lot de dix Lapins dans les conditions habituelles de notre expérimentation. Après des essais préliminaires, nous avons retenu la dose de 300 milligrammes par kilogramme de poids corporel.

b - Résultats expérimentaux (mode d'expression indiqué au chapitre IV).

α - Variations enregistrées au cours des deux premières heures.

TABLEAU N° 17

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes par mm ³	1,6 - 8,4	4,5	0,82
Granulocytes amphophiles par mm ³	1,4 - 21,1	8,2	1,83
Lymphocytes par mm ³	1,5 - 5,3	3,1	0,43
Rapport $\frac{\text{amphophiles}}{\text{lymphocytes}}$	0,54 - 6,1	3,6	0,47
Granulocytes basophiles par mm ³	0,2 - 1	0,5	0,10
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,16 - 0,85	0,3	0,07
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,10 - 0,58	0,2	0,05

Le tableau ci-dessus fait apparaître la leucocytose importante que l'on observe entre la première et la seconde heure, mais ne reflète pas les fluctuations du nombre des leucocytes totaux qui se produisent au cours de la première heure : le prélèvement effectué cinq minutes après l'injection montre d'abord une très brève ascension du taux des leucocytes chez 6 animaux ; puis, en général à la dixième minute, on constate une leucopénie chez 8 Lapins, mais elle est de valeur moyenne assez réduite (moyen terme : 0,8 ; erreur standard : 0,04).

Ce phénomène s'avère beaucoup moins intéressant à souligner que la leucocytose qui le suit car l'importance de cette augmentation (moyen terme : 4,5) et son caractère général (elle se retrouve chez tous les animaux) en font de toute évidence, la réaction la plus caractéristique.

Ces oscillations du nombre des leucocytes totaux ne sont que le reflet de celles des taux des amphophiles et des lymphocytes, mais comme ces dernières ne sont pas simultanées, elles entraînent également des fluctuations dans la valeur du rapport amphophiles.
lymphocytes

Dans les premières minutes, le taux des granulocytes basophiles diminue chez tous les individus, mais cette chute est moins brutale que celle que l'on observe avec le composé 48/80 ; elle apparaît de façon plus sensible si on étudie le pourcentage de ces cellules par rapport aux leucocytes totaux ou, mieux, aux granulocytes amphophiles.

La disparition partielle des basophiles est confirmée par l'étude des frottis de sang colorés à l'azur ou par la technique de MAY-GRUNWALD-GIEMSA : on constate souvent dans les premières minutes qui suivent l'injection une forte proportion d'ombres de GUMPRECHT, et, au niveau des cellules persistantes, une diminution de la métachromasie granulaire ; l'observation de ce dernier phénomène peut être rapprochée des constatations de KELLY (1955), qui montre la suppression de la métachromasie par les protéines basiques ; cependant, la faible concentration sanguine en protamine ne nous permet pas de conclusion formelle.

β - Variations enregistrées entre la seconde et la vingt-quatrième heure .

TABLEAU N° 18

Facteurs étudiés	Variations extrêmes	Moyen terme	Erreur standard
Leucocytes totaux par mm ³	1,54 - 8,43	3,5	0,64
Granulocytes amphophiles par mm ³	1,58 - 25,1	7,3	2,14
Lymphocytes par mm ³	1,25 - 3,70	2,3	0,88
Rapport <u>amphophiles</u> lymphocytes	1,71 - 15,1	6,1	1,23
Granulocytes basophiles par mm ³	1,22 - 10,2	4,4	0,91
Granulocytes basophiles p.100 leucocytes	0,22 - 3,6	1,5	0,44
Granulocytes basophiles p.100 granulocytes amphophiles	0,13 - 2,9	1,1	0,31

L'élévation du nombre des leucocytes totaux est encore assez importante : elle dépasse même chez certains individus les valeurs enregistrées au cours des deux premières heures.

Le taux des amphophiles demeure très supérieur à ce qu'il était au départ, tandis que celui des lymphocytes reste modérément élevé : le rapport amphophiles
lymphocytes témoigne de la forte amphophilie, mais il commence à diminuer, souvent avant la vingt-quatrième heure, moment auquel il devient parfois inférieur à sa valeur initiale.

Le nombre des granulocytes basophiles s'accroît de façon très importante : cette augmentation est le plus souvent objectivée par une élévation des rapports basophiles et basophiles.
leucocytes amphophiles

Y- Résultats tardifs.

Les perturbations hématologiques disparaissent en un temps variable : deux à quatre jours. Cependant on est frappé par deux faits :

- On constate chez 9 animaux une nouvelle chute numérique des granulocytes basophiles, qui se situe à une époque comprise entre le troisième et le huitième jour :

Variations extrêmes de cette chute : 0, 12-0, 73

Moyen terme : 0, 43

Erreur standard : 0, 06

- Deux lapins meurent, l'un au quatrième, l'autre au neuvième jour ; l'abaissement des taux des granulocytes basophiles de ces deux animaux la veille de leur mort était respectivement de 53 et 98 pour 100.

Conclusions

Alors que notre travail était en cours, ARDOINO (1958) publiait le résultat de ses recherches sur les altérations cellulaires sanguines produites par les protéines basiques. Il relevait l'existence d'une leucopénie modique et transitoire et d'une chute du taux des granulocytes basophiles à la quatrième heure ; ses courbes ne montraient pas de remontée dans les quinze heures.

Notre expérimentation a été conduite avec des doses que nous avons fixées au départ plus importantes que celles d'ARDOINO. Elle nous fait enregistrer un abaissement presque immédiat du taux des basophiles (sensible cinq fois sur dix dès le premier prélèvement suivant l'injection), abaissement d'une valeur moyenne voisine de celle constatée avec le composé 48/80. On enregistre avec cette substance, comme avec le sulfate de protamine, une ascension réactionnelle, mais elle est toutefois plus importante avec ce dernier composé.

On pourrait être tenté de rapprocher le mode d'action des deux produits, en remarquant en outre que, si la protamine n'a pas causé de choc visible chez nos animaux, elle a néanmoins entraîné la mort tardive de deux d'entre eux.

La mort est précédée dans chaque cas d'un abaissement du taux des granulocytes basophiles, mais des chutes identiques ont été observées chez d'autres Lapins, sans produire d'accident, soit au cours de la première heure, soit dans les jours suivant l'injection.

La coexistence des deux phénomènes devait être soulignée, sans qu'on puisse cependant y voir une corrélation.

Pour ARDOINO, les modifications induites par les protamines ne sont pas la conséquence directe de l'action de protéines toxiques mais le résultat de l'effet indirect dû à la libération, à partir des tissus, de substances dont les rapports normaux seraient perturbés par la protamine.

Ces conclusions sont à rapprocher de celles de SMITH (1958) qui étudiant l'action de la protéine basique sur les leucocytes tissulaires, constate une libération d'histamine par ces cellules, sans altération cytologique.

Nous nous bornerons donc à conclure que les réactions hémato-logiques produites par le composé 48/80 et le sulfate de protamine sont de même type, mais présentent néanmoins quelques différences.

CHAPITRE X

NUMERATION DIRECTE DES GRANULOCYTES BASOPHILES CHEZ L'HOMME

1 - DIFFICULTES DE LA NUMERATION DIRECTE.

Nous avons insisté au début de ce travail sur les différences cytochimiques observées entre les granulocytes basophiles de l'Homme et ceux du Lapin. Nous n'avons donc été que modérément surprise lorsque, tentant d'appliquer au sang humain la technique utilisée pour l'animal, nous avons constaté que chez certains individus la numération était possible, mais que chez d'autres la présence de cellules réfringentes, sans coloration métachromatique, conduisait à des erreurs par défaut.

Une étude systématique de toutes les techniques publiées jusqu'alors et consignées dans le chapitre III nous ayant montré qu'aucune n'était pleinement satisfaisante, nous nous sommes attachée à rechercher une méthode de numération directe, précise et rapide, utilisable pour les besoins courants de la pathologie.

Cette numération directe soulève un certain nombre de difficultés d'origines diverses.

a - Faible concentration sanguine de ces cellules.

Le taux des granulocytes basophiles dans le sang humain est peu élevé. Des études faites par divers auteurs et de notre expérience personnelle, il ressort un chiffre moyen de 40 par millimètre cube, mais les variations individuelles

sont considérables : chez plus de la moitié des individus normaux, la marge est de 20 à 60, mais les extrêmes connues montent jusqu'à 140 et descendent jusqu'à 10.

Une dilution du sang au 1/10 conduit donc à introduire dans un hématimètre un liquide très pauvre en éléments à décompter. La plupart des auteurs utilisent des cellules de FUCHS-ROSENTHAL, dont la profondeur est de 0,2 mm et le volume total de 3,2 mm³. Dans ces conditions expérimentales, et pour des limites de 20 à 60 basophiles par mm³, on trouvera donc de l'ordre de 6 à 19 cellules. Il est à noter que si la majorité des auteurs effectuent, comme il se doit, une numération sur plusieurs hématimètres, ce n'est toutefois pas la totalité. Or, l'expérience montre que les chiffres qui sont trouvés d'un hématimètre à l'autre sont souvent fort différents malgré le soin qu'on peut apporter à rendre le plus homogène possible le produit de dilution sanguine.

L'évaporation du liquide (même s'il est hydro-alcoolique) pendant le temps de la numération n'est pas, à notre avis, une source d'erreur importante ; quant aux autres hématimètres destinés à être examinés, ils n'en souffrent pas car ils sont évidemment placés en attente dans une chambre humide.

La véritable difficulté vient du temps nécessaire pour dénombrer les basophiles dans 3 à 10 hématimètres, comme le préconisent les auteurs. Un gain appréciable pourrait être réalisé au moyen de cellules de numération de grande profondeur, 0,5 mm par exemple, comme la cellule de NAGEOTTE, mais l'épaisseur du liquide complique le décompte des basophiles : il faudrait que ceux-ci fussent colorés d'une façon sinon parfaite du moins permettant de les distinguer sûrement et instantanément des autres leucocytes. Ce n'est malheureusement pas le cas pour tous ; il existe, comme nous le verrons plus loin, un certain nombre de cellules douteuses pour l'identification desquelles on ne peut avoir recours à un objectif microscopique plus fort (un changement d'oculaire n'apporte rien), eu égard à la distance qui sépare les leucocytes sédimentés de la lentille frontale.

b - La coloration des basophiles.

Elle est toujours réalisée dans les techniques citées plus haut par la mise en évidence de substances chromotropes au niveau des granulations cytoplasmiques par un colorant métachromatique, le bleu de toluidine. Au cours de leur étude, nous avons été frappée par la différence des résultats obtenus suivant la provenance du colorant. Nous préférons,

même au meilleur, les azurs de méthylène, azur I et azur II, ce dernier comportant de petites quantités de bleu de méthylène qui renforce l'activité métachromatique. Quoi qu'il en soit, la coloration se réalise dans un milieu aqueux ou alcoolique faible, à des pH variables.

Or, la teneur élevée en eau a pour premier effet défavorable de conduire à une coloration toujours intense des noyaux des leucocytes, qui contrarie l'identification instantanée des basophiles.

La critique serait mineure si les acides nucléiques n'étaient pas doués, dans les conditions expérimentales préconisées par les diverses techniques, d'une certaine activité métachromatique : la teinte obtenue n'est pas bleue mais violet-rouge, ce qui s'avère extrêmement fâcheux. Quant à la substance chromotrope des granulations cytoplasmiques, son hydro-solubilité a pour conséquence une diffusion. Les effets obtenus diffèrent suivant les cellules, plus exactement suivant le nombre plus ou moins important de granulations et le degré de condensation de substance chromotrope, qu'objectivent parfaitement l'examen des frottis colorés par les méthodes panoptiques habituelles. On peut penser que lors de la dilution sanguine, le passage de l'eau dans le protoplasme précède de peu celui du colorant, qui donne avec la substance chromotrope un composé peu soluble coloré métachromatiquement. Celui-ci reste dans l'immense majorité des cas intra-cellulaire : dans certaines cellules, des granulations très condensées à contenu moins hydrosoluble sont même fixées sensiblement dans leur état primitif, ce qui est excellent car le basophile est rendu immédiatement identifiable mais, à l'inverse, des granulations à structure lâche risquent fort de perdre leur contenu. Chacun sait que dans une même cellule existent des granulations de structure différente ; l'examen en préparations minces permettant l'emploi d'un objectif à immersion montre que, parmi les cellules colorées en milieu liquide, rares sont celles possédant des granulations individualisées et fréquentes celles où prédomine la diffusion. Il est difficile de dire si celle-ci permet une sortie hors de la cellule car cette dernière est entourée d'un liquide bleu rendant l'appréciation difficile. Cependant, une comparaison des basophiles d'aspect "moyen" de divers sangs, colorés sur frottis d'une part et en milieu liquide d'autre part, montre qu'une diffusion suivie d'une insolubilisation intra-cellulaire du contenu total des granulations devrait conduire à une teinte rose ou rouge pâle plus accusée que celle qui est observée.

On se trouve donc ainsi devant des leucocytes présentant tous un noyau à reflet violet-rouge (à des degrés divers

d'ailleurs), les basophiles se reconnaissant pour la plupart à la teinte rose de leur cytoplasme, rarement par des granulations rouges. Il ne s'agit certes pas là de conditions idéales. On pourrait penser qu'elles sont susceptibles d'être améliorées car, contre toute attente, les milieux de dilution ne sont pas choisis acides comme le réclame l'histologie pour les réactions métachromatiques, mais neutres ou légèrement alcalins. Il faut d'ailleurs noter à ce propos que le recours à des solutions tampons de phosphates n'est acceptable que si elles sont diluées, les sels ayant un effet inhibiteur sur la réaction métachromatique. Or si, on essaie d'abaisser le pH du milieu à 3 ou 4 par un acide dilué, on s'aperçoit que la métachromasie des acides nucléiques ne subit aucun changement, ou même s'accroît, et que l'hémolyse par la saponine est plutôt contrariée. Cette acidification favorise la diffusion, mais on peut limiter cette dernière par un sel de plomb, en milieu uniquement aqueux, sans saponine (INAGAKI, 1957).

2 - TENTATIVES D'AMELIORATION SOUS L'ANGLE CYTOLOGIQUE.

Nous avons tenté d'améliorer les techniques déjà existantes, en particulier d'annihiler la réaction métachromatique des noyaux, mais en vain. Il faut, pour arriver à ce résultat, effectuer la coloration dans un milieu pauvre en eau (donc de titre alcoolique plus élevé qu'habituellement), mais on est tout de suite limité par l'insolubilisation des protéines plasmatiques et de l'hémoglobine provenant de la lyse des érythrocytes. Les exigences sont donc contradictoires.

Nous avons alors repris les glycols expérimentés auparavant avec le sang de Lapin, l'hémolyse étant obtenue par l'acide formique. Les contrôles, effectués par dénombrement sur frottis de plus de 35.000 leucocytes, avaient montré une concordance très acceptable. Mais une série d'essais sur le sang humain allaient nous prouver que la transposition n'était pas possible.

Nous avons donc supprimé l'acide formique et essayé divers agents hémolytiques pour finalement adopter le digitonoside.

L'azur II devait montrer qu'il donnait de meilleurs résultats que le bleu de toluidine, et l'éthylène-glycol s'avérer préférable au propylène-glycol pour la conservation du réactif.

Celui-ci, anhydre, permet un mélange en parties égales avec le sang, sans précipitation : les hématies, rendues transparentes, ne sont pas gênantes ; les basophiles, dont les granulations sont colorées en rouge vif, sont reconnaissables au premier coup

d'oeil au milieu des autres leucocytes dont le noyau n'est que faiblement teinté en bleu, sans aucune métachromasie. Il n'existe aucun élément douteux et, du point de vue cytologique, le résultat peut être considéré comme excellent. Mais son application pratique doit tenir compte de ce que dans ce milieu la sédimentation est nulle. Nous avons donc utilisé des cellules spéciales de 40 microns de profondeur et de grande surface, et expérimenté cette technique de nombreuses fois, non pas pour l'exactitude qu'on peut en espérer, car même les basophiles contenant peu de granulations sont immédiatement reconnaissables, mais pour comparer le temps qu'elle requiert pour une numération avec celui des techniques classiques. Le bénéfice est a priori nul puisque ce qui est gagné en taux de dilution ($1/2$ au lieu de $1/10$) est perdu par la profondeur de la cellule (40 microns au lieu de 200). En fait, l'identification instantanée permet tout de même de réaliser un gain de temps de l'ordre de 50 %.

Ce résultat peut paraître suffisant mais il n'en subsiste pas moins que la numération est encore trop longue.

3 - RECHERCHE D'UNE METHODE PLUS RAPIDE .

L'objectif que nous avons poursuivi a été celui d'une dilution finale du sang au $1/10$, à examiner sans erreur cytologique possible dans une cellule hématimétrique de grande profondeur, telle que la cellule de NAGEOTTE (0,5 mm de profondeur, 40 rectangles de 1,25 mm³, soit 50 mm³ de dilution, donc 5 mm³ de sang).

Nous avons dit plus haut qu'il fallait peu attendre des dilutions directes avec un liquide riche en eau si l'on désirait des éléments convenablement colorés. Il était par contre, permis d'espérer que le mélange primaire de réactif et de sang pourrait subir sans modification cytologique sensible une deuxième dilution permettant une décantation. L'expérience a montré qu'il n'en était rien : les milieux aqueux, hydro-alcooliques, les mélanges d'eau et de glycol calculés en fonction du titre du mélange primaire, les changements de pH (au moyen d'acides dilués ou de solutions tamponnées réalisant les gammes les plus variées) n'ont conduit qu'à faire réapparaître des difficultés anciennes ou en créer de nouvelles. C'est en fait surtout la coloration et l'éventuelle métachromasie des noyaux des leucocytes qui constituent le principal obstacle. Nous avons cependant pu le lever en considérant la nature des substances chromotropes des cellules sanguines : celles qui possèdent un radical ionogène carboxyle ne gênant pas, la difficulté consiste à éliminer les réactions des acides nucléiques à radical ionogène phosphate tout en conservant celles des polysaccharides des basophiles à radical ionogène sulfate. Diverses inves-

tigations nous ont conduite à trouver que si la réaction métachromatique due aux sulfo-polysaccharides était comme les autres annihilée par certains sels, elle était susceptible, une fois réalisée, de résister seule à ces derniers. La détermination des sels ne devait pas susciter de difficulté : en dehors du chlorure de sodium, nous avons choisi le chlorure d'ammonium, dont la réaction légèrement acide apportait un appoint à l'inhibition de la métachromasie des noyaux sans nuire à celle des granulations des basophiles.

Il restait un dernier point à préciser : celui des conditions optimales de la réaction métachromatique primitive. L'expérience a montré qu'elles étaient en fait réalisées, non pas quand le réactif était complètement anhydre, mais quand il renfermait environ 1/10 d'eau. Nous avons, par la suite, ajouté des petites quantités d'un surfactif, le tween 80, qui nous est apparu comme favorisant la coloration tout en facilitant la sédimentation des cellules.

Technique

Réactifs .

A -	Azur II de méthylène (Geigy)	0,290 g
	Digitonoside	1,10 g
	Tween 80	1 ml
	Eau distillée	9 ml
	Ethylène-glycol, Q.S.P.	100 ml

Le colorant et le digitonoside sont dissous à chaud dans 60 à 70 ml d'éthylène-glycol.

Le Tween 80 étant un produit visqueux difficile à mesurer avec une pipette, il est préférable d'en préparer une dilution aqueuse au 1/10 (vol./vol.) dont on ajoutera 10 ml à la solution précédente. Il suffit alors de compléter à 100 ml avec de l'éthylène-glycol. Ce réactif est de bonne conservation.

B -	Chlorure de sodium	1,5 g
	Chlorure d'ammonium	1,5 g
	Eau distillée, Q.S.P.	100 ml

Mode opératoire.

Dans un petit tube à hémolyse contenant une bille de verre de 2 à 3 mm de diamètre, introduire 0,040 ml de réactif A avec une pipette de précision. Prélever le sang obtenu par piqûre cutanée, avec une micropipette de 0,040 ml à écoulement total (type GOWERS, pour le dosage de l'hémoglobine, mais de volume double). Rejeter le sang dans le réactif. Agiter le tube quelques secondes pour homogénéiser, aspirer et renvoyer trois ou quatre fois une partie du mélange avec la micropipette à sang (rincage). Boucher le tube avec du coton et laisser une dizaine de minutes. Ajouter ensuite 0,32 ml de solution B, ce qui réalise une dilution finale du sang au 1/10. Mélanger de nouveau. Remplir la cellule de NAGEOTTE munie au préalable d'une lamelle fine. Laisser sédimenter au moins 30 minutes en chambre humide. Effectuer le décompte au microscope, en lumière blanche filtrée par un verre dépoli (combinaison optique optimale : objectif x 37,5 - oculaire x 5,5).

Les leucocytes autres que les basophiles sont colorés en bleu et ceux-ci en rouge vif, les granulations étant facilement visibles.

L'ensemble de la cellule de NAGEOTTE comporte 40 rectangles de 1,25 mm³ chacun soit 50 mm³ correspondant à 5 mm³ de sang.

Pour un sang renfermant 40 basophiles par mm³, le décompte sur la cellule entière montrerait 200 basophiles, soit 5 en moyenne par rectangle. Il faut 1 minute à 1 minute 30 pour examiner un rectangle.

4 - VALIDITE DE LA METHODE

L'examen microscopique des dilutions sanguines montre que les seuls basophiles sont colorés métachromatiquement, les autres cellules étant par ailleurs identifiables. Nous étions donc assurée du caractère qualitatif des numérations. Nous avons alors tenu à comparer les résultats obtenus avec ceux fournis par l'une des techniques classiques, celle d'INAGAKI (1957) ; le matériel avait été au préalable étalonné, en particulier les cellules de NAGEOTTE, au moyen de numérations portant sur plusieurs milliers de leucocytes.

La méthode d'INAGAKI laissant subsister des doutes sur la nature de certains granulocytes basophiles, nous devons tenir compte de ce fait pour apprécier la validité de la technique proposée.

Le tableau comparatif suivant réunira donc pour chaque sang étudié trois nombres correspondant aux granulocytes numérés dans une cellule de NAGEOTTE entière :

A : par la technique proposée.

B : par la méthode d'INAGAKI en ne comptant que les cellules identifiées avec certitude.

C : par la méthode d'INAGAKI en incorporant les cellules douteuses.

TABLEAU N° 19

(voir page 101)

Il ressort de l'examen de ces résultats que la technique proposée donne toujours une différence par excès comparativement à celle d'INAGAKI effectuée selon le type B. Par contre, la concordance est bonne si on opère selon le type C, c'est-à-dire en incorporant les granulocytes douteux à protoplasme discrètement rosé.

Le fait de n'avoir à compter que des cellules immédiatement identifiables conduit à un gain de temps considérable et à une fatigue très réduite.

5 - APPRECIATION DES ERREURS ET CONDUITE A TENIR .

L'inégalité de répartition des leucocytes basophiles sur la surface quadrillée est importante et mérite d'être soulignée par quelques chiffres.

Au cours des douze numérations ci-dessus, effectuées selon la technique proposée, le chiffre des basophiles a été noté pour chacun des 40 rectangles de la cellule de NAGEOTTE, en allant de la gauche vers la droite.

On peut apprécier l'importance de l'erreur commise selon le nombre de rectangles examinés. Chacune des douze numérations étant effectuée sur un sang différent, il est nécessaire pour déterminer la dispersion des résultats individuels d'établir les coefficients de variation (quotient de la déviation standard du résultat final par le nombre de basophiles du sang examiné).

Chaque résultat final envisagé a été calculé à partir de numérations portant sur des nombres différents de rectangles :

TABLEAU N° 19

Sangs N°	Technique proposée A	Coloration INAGAKI B	Différence A - B en %	Coloration INAGAKI C	Différence C - A en %
1	175	151	- 14	184	+ 5
2	223	185	- 17	220	- 1,5
3	180	151	- 16	167	- 7
4	241	223	- 7,5	244	+ 1
5	214	184	- 14	229	+ 7
6	229	165	- 28	236	+ 3
7	148	143	- 3,5	148	0
8	212	190	- 10,5	199	- 6
9	190	161	- 15	170	- 10,5
10	173	161	- 7	176	+ 1,5
11	226	199	- 12	235	+ 4
12	181	170	- 6	188	+ 4

8 groupes de 5 , 4 groupes de 10 et 2 groupes de 20 rectangles, et ceci pour chacun des 12 sangs.

Les résultats sont les suivants :

	<u>Coefficient de variation</u>		
	<u>Minimal</u>	<u>Maximal</u>	<u>Moyen</u>
8 groupes de 5 rectangles	15, 7	32, 4	20, 7
4 groupes de 10 rectangles	8, 9	23, 7	14, 25
2 groupes de 20 rectangles	0, 58	22, 7	9, 0

En dehors de ces circonstances moyennes, il faut surtout examiner ce qui peut se passer dans les conditions les plus défavorables.

Les 12 numérations donnent 12 séries de 40 chiffres, chacune des 480 valeurs correspondant au nombre de granulocytes basophiles comptés dans un rectangle.

Dans chaque groupe de 40, on trouve naturellement des valeurs identiques mais parfois aussi très différentes pour chacun des rectangles.

L'étude de ces disparités montre que le rapport entre le chiffre du rectangle renfermant le plus grand nombre de basophiles et celui du rectangle qui en renferme le moins est très variable.

En éliminant le cas rarissime d'un rectangle sans basophile, ce qui conduit à un rapport infini, les valeurs de ces rapports se situent dans les limites extrêmes, minimale et maximale, de 4 (12/3) et 12 (12/1), avec une moyenne de 9.

Si nous considérons maintenant les chiffres correspondant au nombre total des basophiles contenus dans chaque groupe de cinq rectangles, en allant de la gauche vers la droite de la cellule, nous obtenons pour chaque numération 8 séries de chiffres. Les rapports calculés comme il est indiqué ci-dessus font naturellement apparaître des disparités moins grandes.

En procédant ensuite de la même façon par groupements de 10, puis de 20 rectangles, nous obtenons les résultats présentés dans le tableau suivant :

Conditions de dénombrement	R A P P O R T		
	Minimum	Maximum	Moyen
Par 5 rectangles	1,65	3,10	1,99
Par 10 rectangles	1,22	1,78	1,39
Par 20 rectangles	1,00	1,38	1,14

Il en découle que, si on considère comme exact le taux des basophiles obtenu par le dénombrement de l'hématimètre entier, une numération effectuée seulement sur 5 rectangles risque, dans la plus mauvaise conjoncture, d'être entachée d'une erreur du simple au double (rapport 1,99), qu'avec 10 rectangles l'erreur maximale atteint 39 pour 100 et avec 20 rectangles 14 pour 100.

Il faut d'ailleurs ajouter que ces valeurs ne sont évidemment qu'approximatives étant donné que nous n'avons considéré que des groupes de rectangles choisis les uns à côté des autres. En les prenant au hasard, l'erreur peut être plus grande, mais aussi plus petite.

Quoi qu'il en soit, ces données montrent qu'il faut effectuer les numérations sur 10 rectangles au moins, même si les chiffres individuels font ressortir une homogénéité acceptable. Dans le cas contraire, il convient de pousser l'examen plus loin, ce qui ne conduit pas d'ailleurs à une durée considérable : en effet, l'inspection d'un rectangle demande, comme nous l'avons dit plus haut, un temps variant entre 1 minute et 1 minute 30 suivant les opérateurs. Mais il n'est pas inutile de souligner qu'un décompte de 200 granulocytes basophiles (une cellule de NAGEOTTE entière correspondant à 5 mm³ d'un sang renfermant 40 basophiles par mm³) équivaut, pour un taux également normal de 0,5 %, à l'examen de 40.000 leucocytes sur un frottis.

Conclusions

Nous avons donc préconisé une technique de numération directe des polynucléaires basophiles de l'Homme réalisable en deux temps :

- coloration en milieu relativement anhydre,

- dilution ultérieure par une solution saline qui respecte la réaction métachromatique des granulations cytoplasmiques des basophiles, en supprimant celle des noyaux des leucocytes.

Le décompte s'effectue dans un hématimètre de grande profondeur (0,5 mm) contenant 50 mm³ de dilution, soit 5 mm³ de sang .

Cette technique n'est pas directement utilisable chez le Lapin, mais le devient grâce aux modifications (teneur en sels, addition de nitrate d'uranyle) apportées par PIETTE et LAJOINIE (1962).

oOo

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce travail, nous avons résumé les principales connaissances acquises sur le granulocyte basophile et exposé les résultats de nos recherches relatives à ces cellules.

Nous avons entrepris une étude comparée des polynucléaires basophiles de l'Homme et du Lapin, portant sur plusieurs points :

- a - tentative de dissociation en milieu aqueux du complexe mucopolysaccharide - colorant métachromatique ;
- b - caractérisation cytochimique du soufre de l'héparine (et éventuellement de l'acide chondroïtine-sulfurique);
- c - utilisation de la réaction dite "à l'acide periodique-réactif de SCHIFF".

Elle nous a permis de vérifier à nouveau l'hétérogénéité des granulations cytoplasmiques et de mettre en évidence un degré d'estérification du mucopolysaccharide plus poussé dans les cellules de l'animal que dans celles de l'Homme.

Une technique nouvelle de numération directe des granulocytes basophiles du Lapin a été mise au point dans le but d'étudier l'influence sur les leucocytes d'injections intraveineuses de composés supposés présents au niveau des granulations cytoplasmiques:

- l'héparine produit une lymphocytose certaine et une diminution du taux des granulocytes basophiles, suivie d'une stabilisation précoce ;

- l'acide chondroïtine-sulfurique entraîne une leucopénie suivie d'une leucocytose, avec chute prolongée du nombre des basophiles ;

- l'acide hyaluronique provoque une leucopénie importante et précoce, avec baisse considérable mais retardée du chiffre des granulocytes basophiles.

Des recherches sur l'histamine au moyen du composé 48/80 nous ont montré l'existence assez fréquente d'un choc qui ne s'accompagne pas de leucopénie mais d'une chute importante du taux des polynucléaires basophiles, suivie rapidement d'une réaction inverse dépassant de beaucoup les valeurs de départ.

L'examen des perturbations hématologiques produites par un corps connu pour son action antagoniste de celle de l'héparine - le sulfate de protamine - permet de relever des modifications du même type que celles enregistrées avec le composé 48/80.

Enfin, nous avons mis au point une technique de numération directe des granulocytes basophiles chez l'Homme, réalisable en cellule de NAGEOTTE.

La physiologie du granulocyte basophile humain est encore loin d'être élucidée malgré les importants travaux qui lui ont été consacrés depuis une dizaine d'années, parallèlement à d'autres relatifs aux labrocytes tissulaires, travaux qui font apparaître de nombreux points communs entre les granulations spécifiques des deux catégories de cellules.

Nous espérons que notre contribution, en particulier la mise au point d'une technique de numération de réalisation aisée, pourra faciliter les recherches ultérieures.

Vu le Président de thèse :

Y. RAOUL

Vu le Doyen de la Faculté :

G. VALETTE

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

ACKERMAN (G. A.) et BELLIOS (N. C.), 1955 -

A study of the morphology of the living cells of blood and bone marrow in vital films with the phase contrast microscope. - Blood, 10, 3-16.

AMANN (V. R.) et MARTIN (Von H.), 1961 -

Blutmastzellen und Heparin. - Act. Haemat., 25, 209-219.

ANGELI (G.), TEDESCHI (G.) et CAVAZZUTI (F.), 1955 a -

Sui rapporti tra leucociti basofili del sangue periferico e attività eparinica del plasma. - Il Prog. Méd., 11, 14-16.

ANGELI (G.), TEDESCHI (G.) et CAVAZZUTI (F.), 1955 b -

Sulle variazioni del tasso dei leucociti basofili del sangue periferico dopo somministrazione di eparina. - Min. Med., 46, 752-756.

ANGUIANO (G. L.) et ANCIRA (G. V.), 1955 -

Direct simultaneous total and differential leukocyte counts in the counting chamber. - Act. Haemat., 13, 124-127.

ARCHER (G. T.), 1961 -

Release of heparin from the mast cells of the Rat. - Nature, 191, 90 (une page).

ARDOINO (A. L.), 1958 -

Modifications des cellules sanguines après injection de protamines chez le Lapin. - Rev. Hémat., 13, 311-319.

ARVY (L.), 1955 -

Caractères histologiques et réactions des labrocytes linguaux chez *Rana esculenta*. Modification de ces éléments sous l'action d'un libérateur d'histamine. - C.R. Soc. Biol., 149, 528-530.

ARVY (L.), 1956 -

Action de doses répétées d'un dérivé de la méthylamine sur la richesse du tissu conjonctif et des ganglions lymphatiques en labrocytes, chez le Rat. - C.R. Soc. Biol., 150, 2071-2074.

ARVY (L.) et QUIVY (D.), 1955 a -

Taux des labrocytes linguaux et coagulabilité sanguine chez le Chien au cours de divers chocs. - C.R. Soc. Biol., 149, 481-485.

ARVY (L.) et QUIVY (D.), 1955 b -

Relation entre la richesse en labrocytes et la teneur en histamine des divers segments du tube digestif chez le Chien. - C.R. Soc. Biol., 149, 658-662.

ARVY (L.) et QUIVY (D.), 1956 -

Données sur la répartition des labrocytes chez le Chien. - Bull. Ass. Anatom., 89, 234-241.

ASBOE-HANSEN (G.), 1950 -

The origin of synovial mucin ; Ehrlich's mastcell. A secretory element of connective tissue. - Ann. Rheum. Dis., 9, 149-158.

ASBOE-HANSEN (G.) et WEGELIUS (O.), 1956 -

Histamine and mast cells. Studies on living connective tissue in the Hamster cheek pouch. - Act. Phys. Scand., 37, 349-358.

ASPLUND (J.), BOREL (U.) et HOLMGREN (H.J.), 1939 -

Untersuchungen über die Speicherung des Heparins im Tierorganismus sowie über seine Resorption - möglichkeiten in Darm und Placenta. - Zeit. mikr. anat. Forsch., 46, 16-67.

ASPLUND (J.) et HOLMGREN (H.J.), 1947 -

On the occurrence of metachromatically granulated cells in the

mucous membrane of the human uterus. - Act. Anat., 3, 312-330.

ASTALDI (G.), RONDANELLI (E. G.) et BERNARDELLI (E.), 1953 -

Recherches cytochimiques sur la moelle osseuse et le sang d'une leucémie à basocytes. - Rev. Hémat., 8, 105-117.

ASTALDI (G.) et RONDANELLI (E. G.), 1955 -

Advances in the knowledge of mastleucoblasts and mastcells. - Bull. Fac. Méd. Istanbul, 18, 328-344.

BARBRY (A.), 1955 -

Influence de fortes doses d'héparine sur la mastocytose de la Souris blanche. - C.R. Soc. Biol., 149, 712-714.

BARNETT (R. J.), HAGEN (P.) et LEE (F. L.), 1958 -

Mastcell granules, containing 5-hydroxytryptamine, histamine and heparin, morphologically and biochemically distinct from mitochondria. - Bioch. J., 69, 36 P. (une page).

BEHRENS (M.) et TAUBERT (M.), 1952 -

Der Nachweis von Heparin in den basophilen Leucocyten. - Klin. Wochschr., 30, 76-78.

BELL (H. J.) et JAKES (L. B.), 1956 -

Species differences in heparin. - Bull. Soc. Chim. Belg., 65, 36-49.

BENDITT (E. P.) et MITZIGA (D.), 1955 a -

Observations on the concentration of histamine and heparin in mastcells. - J. Histochem. Cytochem., 3, 385 (une page).

BENDITT (E. P.), WONG (R. L.), ARASE (M.) et ROEPER (E.) 1955b -

5-Hydroxytryptamine in mast cells. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 90, 303-304.

BESSIS (M.) et TABUIS (J.), 1955 -

Formation de cristaux à partir des leucocytes basophiles. - C.R. Soc. Biol., 149, 873-875.

BESSIS (M.) et BRETON-GORIUS (J.), 1959 -

Structure périodique observée au microscope électronique

dans les critaux formés à partir de leucocytes basophiles. -
C.R. Soc. Biol. , 153, 720-721.

BIERMAN (H.R.), KELLY (K.H.), KING (F.W.) et PETRAKIS (N.L.),
1951 -

The pulmonary circulation as a source of leucocytes and pla-
telets in man. - Science, 114, 276-277.

BLOOM (G.), LARSSON (B.) et SMITH (D.E.), 1957 -

Relation of peritoneal mastcells in the Rat to various activa-
tors. - Act. Path. Microb. Scand., 40, 309-14.

BOCAGE (A.), 1943 -

La précision des numérations globulaires. - Ann. Biol.
Clin. , 1, 97-101.

BOIVIN (P.) et ROBINEAUX (R.), 1955 -

Histochimie des cellules sanguines. I - Mise en évidence des
groupes sulfhydyles. - Sang, 26, 757-766.

BOREUS (L.O.), 1960 -

Quantitative studies on the anaphylactic mastcell reaction in
vivo in the Guinea pig. - Act. Physiol., Scand., 48, 43I-438.

BOREUS (L.O.) et CHAKRAVARTY (N.), 1960 -

Tissue mastcells, histamine and "slow-reacting substance"
in anaphylactic réaction in Guinea-pig. - Act. Physiol.
Scand., 48, 315-322.

BOSEILA (A.W.A.), 1958 a -

Influence of cortisone on the basophil granulocytes and the
total white cell count in Rabbit blood. - Act. Endocr., 29,
253-256.

BOSEILA (A.W.A.), 1958 b -

Influence of corticotrophin on the circulating basophils in the
Rabbit. - Act. Endocr., 29, 355-360.

BOSEILA (A.W.A.), 1958 c' -

Influence of histamine liberator substance 48/80 on baso-
phil leucocytes of Rabbit blood. - Proc. Soc. Exptl. Biol.
Med. , 98, I84-I86.

BOSEILA (A.W.A.), 1959 a -

The normal count of basophil leucocytes in human blood. -
Act. Med. Scand., 163, 525-529.

BOSEILA (A.W.A.), 1959 b -

Normal count and physiological variability of Rabbit basophils. -
Experientia, 15, 149-154 .

BOSEILA (A.W.A.), 1959 c.-

Influence of heparin and serotonin on basophil leucocytes of
Rabbit blood. - Experientia, 15, 343-344.

BOSEILIA (A.W.A.), 1959 d -

Identification and counting of basophil leucocytes. - Stain.
Technol., 34, 335-338.

BOSEILA (A.W.A.) et MOLTKE (E), 1958 -

Influence of l-thyroxine on the circulating basophil leucocytes
in the Rabbit. - Act. Endocr., 29, 273-278 .

BOSEILA (A.W.A.) et UHRBRAND (H.), 1958 -

Basophil-eosinophil relationship in human blood. (Studies
on the effect of corticotrophin (A.C.T.H.)). - Act. Endocr.,
28 , 49-53.

BOSEILA (A.W.A.), MOLTKE (E.) et THORSOE, 1959 -

Influence of d.thyroxine and l. thyroxine on the basophil count
in human blood. - Act. Endocr., 32, 284-288.

BOSEILA (A.W.A.) et TOONE (E.C. Jr.), 1961 -

Basophil leucocytes (blood mastcells) in rheumatoid arthri-
tis. - Act. Rheumat. Scand., 7 , 188-190.

BRAUNSTEINER (H.) et coll. -

Voir VON BRAUNSTEINER et coll.

BURKL (W.), 1952 -

Über Mastzellen und ihre Aufgaben. - Wien. Klin. Wochschr.,
64, 411-415 .

CAMERADA (P.) et LEO (P.), 1955 -

Modificazioni indotte della tiroxina sul tasso ematico dei leucociti basofili. - *Rass. med. Sarda.*, 57, 163-166.

CARTWRIGHT (G. E.), 1954 -

Diagnostic Laboratory Hematology. - Grune et Stratton édit., New York.

CASELLI (P.), 1957 -

Protamine sulfate effect on basophilic granular cells. - *Hæmatol.*, 42, 111-128.

CASS (R.), RILEY (J. R.), WEST (G. B.), HEAD (K. W.) et STROUD (S. W.), 1954 - Heparin and histamine in mastcell tumors from Dogs. - *Nature (London)*, 174, 318-319.

CASS (R.), MARSHALL (P. B.) et RILEY (J. F.), 1958 -

5-hydroxy-tryptamine and histamine in mastcells of the Mouse and Rat. - *J. Physiol.*, 141, 510-519.

CAVAZZUTI (F.), TEDESCHI (G.) et ANGELI (G.), 1959 -

Rapporti tra funzionalità tiroidea e leucociti basofili. - *Minerva Med.*, 50, 2352-2358.

CODE (C. F.), 1937 a -

The source in blood of histamine like constituent. - *J. Physiol.*, 90, 349-364.

CODE (C. F.), 1937 b -

The histamine-like activity of white blood cells. - *J. Physiol.*, 90, 485-500.

CODE (C. F.) et ING (H. R.), 1937 -

The isolation of histamine from the white-cell layer of centrifuged Rabbit blood. - *J. Physiol.*, 90, 501-510.

CODE (C. F.), MITCHELL (R. G.) et KENNEDY (J. C.), 1954 -

The effect of cortisone on the number of circulating basophils and eosinophils : is there a relationship between these cells ? - *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clin.*, 29, 200-204.

CODE (C. F.) et MITCHELL (R. G.), 1957 - Histamine, eosinophils and basophils in the blood. - *J. Physiol.*, 136, 449-468.

DANTCHEV (D.), 1952 -

Particularités morphologiques dans la formation des granulocytes éosinophiles et basophiles. - Sang, 23, 439-445.

DEGOS (R.) et COTTENOT (F.), 1953 -

Physiologie du mastocyte tissulaire (rôle de la surrénale dans le stockage mastocytaire). - Bull. Soc. Derm. Syph., 60, 228 (une page).

DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.), 1930 -

Précis de chimie analytique. - Maloine édit., Paris.

EHRICH (W. E.), 1953 -

Histamine in mastcells. - Science, II8, 603 (une page).

EHRlich (P.), 1877 -

Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. - Arch. f. mikr. Anat., 13, 263-277.

EHRlich (P.), 1891 -

Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes. - Hirschwald édit., Berlin.

ELLIS (J. M.), 1949 -

Urticaria pigmentosa. A report of a case with autopsy. - Arch. Pathol., 48, 426-435.

FAWCETT (D. W.), 1954 -

Cytological and pharmacological observations on the release of histamine by mastcells. - J. Exptl. Med., 100, 217-224.

FEINBERG (S. M.) et STERNBERGER (L. A.), 1955 -

Action of histamine-liberator compound 48/80 in the Guinea pig with a review of previous reports on its action on other species. - J. Allergy, 26, 170-179.

FLECK (L.), 1956 -

Etat actuel des recherches sur la leucergie. - Sang, 27, 376-381.

FONTAINE (R.), MANDEL (P.) et Melle LUX, 1953 -

Que devient l'héparine injectée par voie endoveineuse ? Etude de son rythme d'élimination chez l'Homme. - Pr. Méd., 69, 1397-1398.

FRIBERG (U.), GRAF (W.) et ABERG (B.), 1951 -

On the histochemistry of the mast cells.-Act. Path. Microb. Scand., 29, 198-202.

FRICK (R.), 1950 -

Zur Physiopathologie der Mastzellen (Heparin speicherung und ausschüttung). - Act. Haemat., 4, 97-109.

GAJDOS (A.) et TIPREZ (G.), 1947 -

Signification biologique des corpuscules de Heinz. Leur rapport avec les verdoglobines. - Sang, 18, 35-43

GIROD (C.), 1956 -

Effets d'une injection d'acétate de désoxycorticostérone sur la lignée blanche chez le Singe. - C.R. Soc. Biol., 150, 1522-1527.

GRAF (W.) et SWENSSON (A.), 1950 -

Experimental investigations on local changes in the white blood cell picture following perforating injury to blood vessels (veins). - J. Path. Bact., 62; 419-427.

GRAHAM (H. T.), WHEELWRIGHT (F.), PARISH (H. H. Jr), MARKS (A. R.), et LOWRY (O. H.), 1952 -

Distribution of histamine among blood elements. - Feder. Proc., 11, 350 (une page).

GRAHAM (H. T.), LOWRY (O. H.), WAHL (N.) et PRIEBAT (M. K.) 1955a-

Mast cells as sources of tissue histamine. - J. Exptl. Med., 102, 307-318.

GRAHAM (H. T.), LOWRY (O. H.), WHEELWRIGHT (F.), LENZ (M. A.) et PARISH (H. H. Jr.), 1955 b -

Distribution of histamine among leukocytes and platelets. - Blood, 10, 467-481.

HAGEN (P.), BARNETT (R. J.) et LEE (F. L.), 1959 -

Biochemical and electronmicroscopic study of particles isolated from mastocytoma cells. - J. Pharmacol. Exptl. Thérap., 126, 91-108.

HALPERN (B.N.), BIOZZI (G.), BRIOT (M.) et BENACERRAF (B.), 1953. -

Modalités de la recharge des tissus en histamine après sa déplétion par une substance libératrice d'histamine et action empêchante de la cortisone sur cette recharge. - C.R. Soc. Biol., 147, 1180-1184.

HEDBOM (A.) et SNELLMAN (O.), 1955 -

Isolation and analysis of the large cytoplasmic granules of tissue mast cells. - Exper. Cell Research, 9, 148-156.

HELLER (J.), 1904 -

Ein Beitrag zur Genese der Mastzellen der Haut. - Deutsch med. Wochschr., 30, 507-509.

HELLWEG (G.), 1957 -

Über Auftreten und Verhalten der endometrialen Körnchenzellen im Verlauf der Schwangerschaft, im krankhaft veränderten Endometrium und ausserhalb des Corpus Uteri. - Virchows Arch., 330, 658-680.

HILL (M.) et PROPISIL (M.), 1960 -

Idnetity of the cortisol and heparin effects on mast cells. - Arch. intern. Pharmacodyn. Therap., 124, 139-149.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.), 1951 a -

Sur la formation des mastocytes et l'origine de l'héparine. - Bull. Acad. Nat. Med., 135, 408-409.

HISSARD (R.), MONCOURIER (L.) et JACQUET (J.), 1951 b -

Etude d'une nouvelle hémato-dermie, la mastocytose. - Pr. Méd., 59, 1765-1767.

HOGBERG (B.) et UVNAS (B.), 1957 -

The mechanism of the disruption of mast cells produced by compound 48/80. - Act. Physiol. Scand., 41, 345-369.

HOGBERG (B.) et UVNAS (B.), 1958 -

Inhibitory action of Allicin on degranulation of mast cells produced by compound 48/80, histamine liberator from Ascaris, Lecithinase A, and Antigen. - Act. Phys. Scand., 44, 157-162.

HUNT (T.E.) et HUNT (E.A.), 1959 -

Blood basophils of Cockerels before and after intravenous injection of compound 48/80. - Anat. Rec., 133, 19-31.

HUNT (T.E.), HUNT (E.A.), et CURRY (D.), 1961

Basophil leucocytes and mast cells in the Rabbit before and after intravenous injection of compound 48/80. - Anat. Rec., 140, 123-133.

INAGAKI (S.), 1956 -

Clinical studies on the relationship between thyroid function and level of circulating basophil leucocytes. - Act. Haemat. Japan, 19, 662-667.

INAGAKI (S.), 1957 -

The relationship between the level of circulating basophil leucocytes and thyroid function. - Act. Endocr., 26, 477-488.

ISIDOR (P.), 1954 -

Essai d'identification des granules mastocytaires et des inclusions histiocytaires de la plaie héparinée de Cobaye. - Bull. Microscop. appl., 4, 41-44.

JOLLY (J.), 1923 -

Traité d'Hématologie, Maloine édit. , Paris .

JORPES (J. E.), 1946 -

Heparin in treatment of thrombosis. - Oxford Univ. Press, New-York.

JORPES (J. E.), HOLMGREN (H.) et WILANDER (O.), 1937 -

Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßswänden und in den Augen, - Zeitsch. mikr. anat. Forsch. , 42, 279-300.

JORPES (J. E.), et GARDELL (S.), 1948 -

Heparin monosulfuric acid. - J. Biol. Chem., 176, 267-276.

JORPES (J. E.), BOSTROM (H.) et MUTT (V.), 1950 -

The linkage of the amino-group in heparin. - J. Biol. Chem., 183, 607-615.

JULEN (C.), SNELLMAN (O.) et SYLVEN (B.), 1950 -

Cytological and fractionation studies on the cytoplasmic constituents of tissue mast cells. - Act. Physiol., Scand., 19, 289-305.

KELLER (R.), 1957 -

Tissue mast cells in anaphylactic shock and anaphylactoid reactions. - Intern. Arch. Allerg. appl. Immunol., 11, 328-341.

KELLER (R.), 1958 -

Zur Bindung von Histamin und Serotonin in den Mastzellen. - Arzneimitt. Forsch., 8, 390-394.

KELLY (J.W.), 1955 -

Suppression of metachromasy by basic proteins. - Arch. Bioch. Biophys., 55, 130-137.

KELLY (J.W.) et BLOOM (G.), 1958 -

Cytophotometry of metachromatic staining in mast cells. - J. Histochem. Cytochem., 6, 402-403.

KERBY (G.P.), 1955 -

The occurrence of acid mucopolysaccharides in human leucocytes. - J. Clin. Invest., 34, 944 (une page) .

KOBAYASHI (Y.), 1962 -

Histamine binding by heparin. - Arch. Bioch. Biophys., 96, 20-27.

KOKSAL (M.), 1953 -

Extraction of a heparin-like substance from mast cell granules in Mouse connective tissue. - Nature (London), 172, 733-734.

LABENDZINSKI (F.), 1956 -

Recherches quantitatives sur les basophiles du sang périphérique au moyen de la goutte épaisse. - Sang, 27, 432-437.

LAGUNOFF (D.), PHILLIPS (M.) et BENDITT (E.P.), 1960

Histochemical demonstration of histamine. - J. Histochem. Cytochem., 8, 325 (une page).

LAMBRECHTS (A.), NIZET (A.) et EL KHADY, 1946 -

Sulfamidés, phénylhydrazine et granulations de Heinz in vitro. - C.R. Soc. Biol., 140, 1091-1093.

LAVERGNE (G.H.), TROCHARD (B.) et FOURNIER (S.), 1953 -

Quelques facteurs modifiant la coloration et l'observation des granulations basophiles des érythrocytes ponctués (fond noir). - Sang, 24, 546-549.

LISON (L.), 1960 -

Histochimie et cytochimie animales. - Gauthier-Villars édit., Paris.

MACALLUM (A.B.), 1912 -

Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, vol. 2, p. 1145 (d'après LILLIE (R.D.)). Histopathologic technic and practical histochemistry. The Blakiston Compagny édit. New-York, 1954).

MAC KAY (D.G.), 1950 -

Metachromasia in the endometrium. - Amer. J. Obst. Gynec. 59, 875-882.

MAGNI (A.) et PARMIGIANI (G.), 1956 -

Modificazioni del tasso ematico e midollare di cellule a granulazioni basofile nel trattamento eparinico. - Bollet. Soc. Med. Chir. Cremona, 10, 92-101.

MAGNUSSON (S.) et LARSSON (B.), 1955 -

Uptake of S³⁵-labeled sulfate in the heparine of a dog mastocytoma. - Act. Chem. Scand., 9, 534-535.

MARBET (R.) et WINTERSTEIN (A.), 1951 -

Problème der Blutgerinnung. β -Heparin, ein neuer, blutgerinnungskemmender Mucoitinschwefelsäureester. Helv. Chem. Act., 34, 2311-2320.

MARINONE (G.) 1947 -

Sur la solubilité des granulations des mastzellen dans les leucémies myéloïdes. - Sang, 18, 405-406.

MARTIN (H.) et coll. -

Voir VON MARTIN (H.) et coll.

MARX (W.), MARX (L.), RUCKER (P.), RUGGERI (L.) et FREEMAN (L.), 1957 -

Tissue heparin and mast cells in Rats and Rabbits. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 94, 217-220.

MAXIMOW (A.), 1906 -

Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. - Arch. mikr. Anat., 67, 680-756.

MENEHINI (C. L.) et HOFMANN (M. F.), 1961 -

Urticaria pigmentosa. Klinische und pathogenetische Beobachtungen bei 14 Fällen. - Arch. klin. exper. Dermatol., 213, 639-650.

MICHELS (N. A.), 1938 -

The mast cells, dans DOWNEY (H.), Handbook of Hematology, Hoeber édit., New-York.

MINARD (D.), 1940 -

The presence and distribution of histamine in blood. - Amer. J. Physiol., 132, 327-335.

MITCHELL (R. G.), 1955 -

Circulating basophilic leucocyte counts in the newborn. - Arch. Disease Childhood, 30, 130-132.

MITCHELL (R. G.) et CASS (R.), 1959 -

Histamine and 5-hydroxy-tryptamine in the blood of infants and children. - J. Clin. Invest., 38, 595-604.

MOORE (J. E.) et JAMES (G. W.), 1953 -

A simple direct method for absolute basophil leucocyte count. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 82, 601-603.

MORELLE (L.), 1931 -

Sur le comportement des leucocytes basophiles dans certains chocs expérimentaux. - C.R. Soc. Biol., 107, 904-905.

MOTA (I.), 1957 -

Anaphylactic shock and anaphylatoxin on mast cells and histamine in Rats. - Brit. J. Pharmacol., 12, 453-456.

MOTA (I.), BERALDO (W. T.) et JUNQUEIRA (L. C. U.), 1953 -

Protamine-like property of compounds 48/80 and stilbamidine and their action on mast cells. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 83, 455-457.

NETTER (A.), YANEVA (H.) et LAMBERT (A.), 1956 -

D'une variété particulière de cellules dans le sang des règles: les ménocytes. - Ann. Endocr., 17, 172-174.

NIZET (A.), 1946 -

L'action de la phénylhydrazine sur les hématies in vitro. - C.R. Soc. Biol., 140, 1094-1097.

NORTON (S.), 1954 -

Quantitative détermination of mast cell fragmentation by compound 48/80. - Brit. J. Pharmacol., 9, 494-497.

OLIVER(J.), BLOOM (F.) et MANGIERI (C.), 1947 -

On the origin of heparin. An examination of the heparin content and specific cytoplasmic particles of neoplastic mast cells. - J. Exptl. Med., 86, 107-116.

OSADA (Y.), 1956 -

Diurnal rhythms in the numbers of circulating basophils and eosinophils in healthy adults. - Bull. Inst. Publ. Health., 5, 5 (d'après BOSEILA (A.W.A.), The basophil leucocyte, Munksgaard édit., Copenhague, 1959).

OSGOOD (E.E.), SEAMAN (A.J.), TIVEY (H.) et RIGAS (D.A.), 1954 -

Duration of life and of the different stages of maturation of normal and leukemic leukocytes. - Rev. Hemat., 9, 543-554.

PAFF (G.H.) et MERGENTHALER (D.D.), 1955 -

Vacuolation in normal mast cells and in mast cells treated with protamine sulfate. - Anat. Rec., 121, 579-591.

PARRATT (J.R.) et WEST (G.B.), 1957a -

Histamine liberation in the Hamster. - Arch. intern. Pharmacod. Therap., 113, 209-216.

PARRATT (J.R.) et WEST (G.B.), 1957b -

5-hydroxytryptamine and tissue mast cells. - J. Physiol., 137, 169-178.

PARROT (J.L.) et LABORDE (C.), 1951 -

Captation de l'histamine par l'héparine. C.R. Soc. Biol., 145, 1047-1051.

PATON (W.D.M.), 1951 -

Compound 48/80 : a potent histamine liberator, - Brit. J. Pharmacol., 6, 499-508.

PATON (W.D.M.) et SCHACHTER (M.), 1951 -

The influence of an antihistamine drug on the release of histamine in the unanaesthetized Dog. - Brit. J. Pharmacol. Chemoth., 6, 509-513.

PEARSE (D.C.), 1955 -

Marrow cells seen with the electron microscope after ultra-thin sectioning. - Rev. Hemat., 10, 300-313.

PIETTE (M.), 1955a -

Méthode de coloration des granulocytes basophiles du sang en milieu hydro-alcoolique à pH : 4. - Ann. Pharm. Fr., 13, 681-683.

PIETTE (M.), 1955b -

Influence de la viscosité sur la lyse des granulocytes basophiles en milieu aqueux et coloration de ces éléments en présence de sulfate de protamine. -C.R. Ac. Sci., 241, 109-111.

PIETTE (M.), 1958 -

Hydrolyse des acides nucléiques des leucocytes sanguins après traitement prolongé par l'acétate basique de plomb en milieu alcalin. -Ann. Pharm. Fr., 16, 311-313.

PIETTE (M.) et LAJOINIE (C.), 1962 -

Problèmes pratiques posés par la numération directe des granulocytes basophiles du sang chez le Lapin. Technique permettant un dénombrement rapide de nombreuses cellules. - Path. Biol., 10, 1331-1334.

PINNA PINTOR (P.) et GRASSINI (V.), 1957 -

Individual and seasonal spontaneous variations of haematological values in normal male Rabbits. Statistical survey. - Act. Haemat., 17, 122-128.

PISCHINGER (A.), 1957 -

Über das Schicksal der Leukocyten. - Zeit. f. mikr. anat. Forsch., 63, 169-192.

POLICARD (A.), COLLET (A.) et PREGERMAIN (S.), 1959 -

Les cellules basophiles et éosinophiles du sang et des tissus chez le Rat. Etude au microscope électronique. - Rev. Hémat., 14, 278-293.

POLICARD (A.), COLLET (A.), MARTIN (J.C.) et PREGERMAIN (S) 1962 -

Sur une disposition périodique infra-microscopique dans les granulations de leucocytes basophiles ganglionnaires. - Nouv. Rev. Fr. Hémat., 2, 915-917.

REGAUD (C.) et LACASSAGNE (A.), 1922 -

A propos des épithéliomas, l'importance de la fixation pour la coloration des granulations des mastocytes. - C.R. Soc. Biol. 87, 1084-1086.

RICE (W.G.) et MITCHENER (J.), 1961 -

Histochemical evidence of 5-hydroxytryptamine in a Dog mast cell tumor. - Nature (London), 189, 767-768.

RILEY (J. F.), 1953 -

The effects of histamine-liberators on the mast cells of the Rat. - J. Path. Bact., 65, 471-479.

RILEY (J. F.) et WEST (G. B.), 1953 -

The presence of histamine in tissue mast cells. - J. Physiol., 120, 528-537.

RILEY (J. F.) et WEST (G. B.), 1955 -

Tissue mast cells. Studies with a histamine-liberator of low toxicity. - J. Path. Bact., 69, 269-282.

ROCHA e SILVA (M.) et ANDRADE (S.O.), 1943 -

Histamine and proteolytic enzymes-liberation of histamine by papafn. - J. Biol. Bioch., 149, 9-17.

ROGERS (G.E.), 1956 -

Electron microscopy of mast cells in the skin of young Mice. - Exptl. Cell res., 11, 393-402.

RONDANELLI (E. G.), 1956 -

Biochemistry of specific granules in mast leucoblasts, mast leucocytes and mast cells in normal and pathological conditions. A cytochemical evaluation. - *Excerpta Med.*, Sect. II, 9, 516 (une page).

RORSMAN (H.), 1957 -

Basophil leucocytes and urticaria. - *Act. Dermato-venereol.* - 37, 121-128 .

RORSMAN (H.), 1958 -

Basophil leucocytes in urticaria, asthma and atopic dermatitis. - *Act. Allerg.*, 12, 205-208.

RORSMAN (H.) , 1962 -

Studies on basophil leucocytes with special reference to urticaria and anaphylaxis . - *Act. Dermato-Venereol.*, 42, supp. 48, 1-20.

RORSMAN (H.) et ROSENGREN (E.), 1958 -

Basophil leucocytes and blood histamine in urticaria. - *Act. Dermato-Venereol.*, 38, 377-393.

ROYER (P.), 1959 -

La cellule de Buhot et le diagnostic de gargoylisme. - *Sang*, 30, 37-40.

SANYAL (R.K.) et WEST (G.B.), 1956 -

Binding of histamine in mammalian tissues. - *Nature (London)*, 178, 1293 (une page).

SCHACHTER (M.), 1953 -

Anaphylaxis and histamine release in the Rabbit. - *Brit. J. Pharmacol. Chemoth.*, 8, 412-419.

SCHAUER (A.) et WERLE (E.), 1959 -

Zur histochemischen Darstellung des Histamins der Mastzellen. - *Zeitsch. Ges. exper. Med.*, 131, 100-104.

SCHAYER (R.W.), SMILEY (R.L.) et DAVIS (K.J.), 1956 -

Formation and binding of histamine by free mast cells of rat peritoneal fluid. - *Amer. J. Physiol.*, 186, 199-202.

SCHILLER (S.) et DORFMAN (A.), 1959 -

Isolation of heparin from mast cells of the normal Rat. - Bioch. Biophys. Act., 31, 278-290.

SCHINDLER (R.), DAY (M.) et FISCHER (G.A.), 1959 -

Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro. - Cancer Res., 19, 47-51.

SHELLEY (W.B.) et JUHLIN (L.), 1961 -

A new test for detecting anaphylactic sensitivity : the basophil réaction. - Nature (London), 191, 1056-1058.

SJOERDSMA (A.), WAALKES (T.P.) et WEISSBACH (H.), 1957 -

Serotonin and histamin in mast cells. - Science, 125, n° 3259, 1202-1203.

SMITH (D.E.), 1958 -

Nature of the secretory activity of the mast cell. - Amer. J. Physiol., 1958, 193, 573-575.

SUNDBERG (R.D.), SCHAAR (F.E.), POWELL (M.J.S.) et DEN-BOER (D.), 1954 -

Tissue mast cells in human umbilical cord, and the anticoagulant activity of dried extracts of cords and placentae. - Anat. Rec., 118, 35-36.

THONNARD-NEUMANN (E.), 1958 -

Basophile Leukozyten und Steroidhormone. - Medizinische, 2, 1087-1090.

THONNARD -NEUMANN (E.), 1961 -

The influence of hormones on the basophilic leukocytes. - Act. Haemat., 25, 261-270.

TOTTERMAN (G.), 1948 -

Are the basophilic leucocytes "heparinocytes" ? - Act. Med. Scand., 130, 176-182.

TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.), 1954 -

Différents degrés de synthèse héparinique au niveau des basophiles du sang normal et au cours de certaines leucoses. - C.R. Soc. Biol., 148, 2065-2067.

TURCHINI (J.), BESCOL-LIVERSAC (J.) et KHAU VAN KIEN (L.), 1958 -

De la réponse des mastocytes du Rat à l'injection de quelques substances rentrant dans la constitution de leurs granulations. - Ann. Histoch., 3, 127-133.

TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.), 1959 -

Dégradation de l'héparine dans le tissu sous-cutané du Rat. Comportement des mastocytes à ce niveau et dans les ganglions lymphatiques correspondants. - C.R. Ass. Anat., 104, 837 (une page).

UNDRITZ (E.), 1946 -

Les cellules sanguines de l'Homme et dans la série animale. - Schw. mediz. Wochschr., 76, 88-115.

UVNAS (B.), 1961 -

Mechanism of release from mast cells. - Chemotherapia, 3, 137-149.

VALENTINE (W.N.), PEARCE (M.L.) et LAWRENCE (J.S.), 1950 -

Studies on the histamine content of blood, with special reference to leukemia, leukemoid réactions and leukocytoses. - Blood, 5, 623-647.

VALENTINE (W.N.), LAWRENCE (J.S.), PEARCE (M.L.) et BECK (W.S.), 1955 -

Relationship of the basophil to blood histamine in Man. - Blood 10, 154-159.

VAN ARSDEL (P.P. Jr.) et BRAY (R.E.), 1961 -

Release of histamine from Rat peritoneal mast cells by compound 48/80 ; effect of metabolic inhibitors. - J. Pharmacol. Exptl. Therap., 133, 319-324.

VELICAN (C.) et VELICAN (D.), 1958 -

Le mastocyte expérimental. - Pr. Méd., 66, 1689-1692.

VELICAN (C.) et VELICAN (L.), 1959 -

Histochemical investigations on the presence of hyaluronic acid in mast cells. - Act. Haemat., 21, 109-117.

VERCAUTEREN (R.), 1953 -

The properties of the isolated granules from blood eosinophiles. - Enzymologia, 16, 1-13.

VON BRAUNSTEINER (H.) et THUMB (N.), 1958 -

Quantitative Veränderungen der Blutbasophilen und ihre klinische Bedeutung. - Act. Haemat., 20, 339-349.

VON MARTIN (H.) et ROKA (L.), 1953 -

Zur Frage des Heparin-Gehaltes der Blutmastzellen des Menschen. - Act. Haemat., 10, 26-31.

VON SCHURER (W.), 1946 -

Speicherung von Heparin in der Zellen des Reticuloendothels. - Helv. Med. Act., 13, 161-171.

WALTON (K.W.) et RICKETTS (C.R.), 1954 -

The histochemical basis of metachromasia. - Brit. J. Exptl. Path., 35, 227-240.

WEILL (P.), 1921 -

Etudes sur les leucocytes. I- Les cellules granuleuses des muqueuses intestinale et utérine. - Arch. Anat. microsc., 17, 77-82.

WINQVIST (G.), 1960 -

The ultrastructure of the granules of the basophil granulocytes. - Zeit. f. Zellforsch. Mikr. Anat., 52, 475-481.

WINQVIST (G.), 1963 -

Electron microscopy of the basophilic granulocyte. - Ann. N.Y. Ac. Sc., vol. 103, Art. 1. Mast cells and Basophils, 352-375.

WISLOCKI (G.B.) et DEMPSEY (E.W.), 1946 -

Observations on the chemical cytology of normal blood and hemopoietic tissues. - Anat. Rec., 96, 249-277.

WISLOCKI (G.B.), RHEINGOLD (J.J.) et DEMPSEY (E.W.), 1949 -

The occurrence of the periodic acid-SCHIFF reaction in various normal cells of blood and connective tissue. - Blood, 4, 562-568.

ZACHARIAE (F.), ASBOE-HANSEN (G.) et BOSEILA (A.W.A.), 1958-

Studies on the mechanism of ovulation. - Act. Endocr., 28, 547-552.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION - <u>Granulocytes basophiles, labrocytes</u> <u>et autres cellules à granulations métachromatiques..</u>	1
CHAPITRE I - <u>Connaissances acquises sur le granulocyte</u> <u>basophile et objet du travail.....</u>	3
1 - Aspects cytologiques.....	3
a - Coloration panoptique	3
b - Examen au microscope électronique	4
c - Examen en contraste de phase	4
2 - Principaux constituants chimiques présents dans les granulations.....	5
a - Héparine	5
b - Histamine	6
c - Sérotonine	8
3 - Physio-pathologie	8
a - Origine et nombre	8
b - Les variations physiologiques et pathologiques ...	9
4 - Objet des recherches	10
CHAPITRE II - <u>Etudes cytochimiques.</u>	13
1 - Essais de dissociation en milieu aqueux	13
a - Chez l'Homme.....	13
b - Chez le Lapin	16

2 - Caractérisation du soufre héparinique	19
a - Etude critique de la réaction	19
b - Modalités techniques et essais d'interprétation ...	26
3 - Appréciation du degré d'estérification sulfurique de l'héparine.....	30
a - La réaction P.A.S.	30
b - Résultats enregistrés chez l'Homme	32
c - Résultats enregistrés chez le Lapin	34

CHAPITRE III - Méthode de numération des granulocytes basophiles dans le sang circulant du Lapin. 39

1 - Remarques sur la numération directe des granulocytes basophiles du sang.....	39
a - Sa nécessité	39
b - Ses difficultés	40
c - Etude critique des techniques existantes	41
2 - Mise au point d'une technique utilisable chez le Lapin.	42
a - Recherches	42
b - Technique adoptée	44
c - Résultats	46

CHAPITRE IV - Variations hématologiques enregistrées chez le Lapin après injection d'un soluté isotonique de chlorure de sodium...... 51

1 - Protocole opératoire général.....	51
2 - Résultats	55

CHAPITRE V - Variations hématologiques après injection d'héparine 61

1 - Résultats expérimentaux observés sur les labrocytes.	61
2 - Travaux personnels	62
a - Protocole opératoire et posologie	62
b - Résultats	63

CHAPITRE VI - <u>Variations hématologiques après injection d'acide chondroïtine-sulfurique.</u>	69
1 - Raisons du choix de ce composé	69
2 - Travaux personnels	69
a - Protocole opératoire et posologie	69
b - Résultats	70
CHAPITRE VII - <u>Variations hématologiques après injection d'acide hyaluronique</u>	75
1 - Résultats expérimentaux observés sur les labrocytes..	75
2 - Travaux personnels	76
a - Protocole opératoire et posologie	76
b - Résultats expérimentaux	76
CHAPITRE VIII- <u>Variations hématologiques après injection d'un composé libérateur d'histamine</u>	81
1 - Résultats expérimentaux enregistrés sur les labrocytes	81
2 - Travaux personnels	82
a - Choix du produit utilisé	82
b - Posologie	82
c - Résultats expérimentaux	83
CHAPITRE IX - <u>Variations hématologiques après injection de sulfate de protamine.</u>	89
1 - Résultats expérimentaux enregistrés sur les labrocytes	89
2 - Travaux personnels	90
a - Protocole opératoire et posologie	90
b - Résultats expérimentaux	90

CHAPITRE X - Numération directe des granulocytes basophiles chez l'Homme.	95
1 - Difficultés de la numération directe	95
2 - Tentatives d'amélioration sous l'angle cytologique	98
3 - Recherche d'une méthode plus rapide	99
4 - Validité de la méthode.....	101
5 - Appréciation des erreurs et conduite à tenir	102
CONCLUSIONS GENERALES	105
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	I

oOo

